Nicht für den Austausch

ZOOLOGIE

Untersuchungen über Vitaminbedarf und Wachstumsfaktoren bei Insekten

---

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

vorgelegt von

Gustav Fröbrich
aus Groß-Rosen

Breslau 1939

Breslauer Genossenschafts-Buchdruckerei E. G. m b H., Breslau 1, Ursulinerstr. 1

Referent: Professor Dr. Goetsch
Korreferent: Dozent Dr. Koch

Examen rigorosum: 26. April 1939

Gedruckt mit Genehmigung der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

(Aus dem Zoologischen Institut Breslau.)

UNTERSUCHUNGEN ÜBER VITAMINBEDARF UND WACHSTUMSFAKTOREN BEI INSEKTEN[1].

Von

GUSTAV FRÖBRICH.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 9. Mai 1939.)

Inhaltsverzeichnis.

Seite

A. Einleitung und historischer Überblick 336
B. Spezieller Teil 339
Ephestia kühniella 340
Tribolium confusum 340
I. Material und Methode 341
II. Der Einfluß verschiedener Diäten auf die Entwicklung von *Tribolium confusum* 342
1. Weizenmehl S. 342. — 2. Vitaminfreie Mangeldiät mit und ohne Hefezusatz S. 342. — 3. Prüfung des Fettbedarfs S. 342. — 4. Einzelprüfung der anderen Komponenten der Mangeldiät S. 343.
III. Untersuchung des Verhaltens der Tiere gegen mit Vitaminpräparaten versetzte Mangeldiät 344
IV. Die Analyse der Hefefaktoren 345
1. Aufspaltung der Hefe in wasserlösliche und wasserunlösliche Komponenten S. 345. — 2. Analyse der wasserlöslichen Komponente der Hefe S. 346. — a) Nachweis des B_1-Bedarfs S. 346. — b) Vorläufige Feststellung eines B_1-Optimums S. 347. — c) Nachweis des B_2-Bedarfs S. 348. — d) Feststellung des B_2-Optimums S. 352. — e) Endgültige Feststellung des B_1-Optimums S. 353. — f) Der komplexe Faktor B_x S. 355. — Vorkommen des B_x S. 356. — Identifizierungsversuche S. 357. — Chemische Eigenschaften S. 358.
3. Untersuchung des im wasserunlöslichen Teil der Hefe befindlichen Wachstumsfaktors S. 363. — a) Reaktionsempfindlichkeit von Tribolium auf die wasserunlösliche Komponente S. 364. — b) Versuch der Identifizierung dieses Faktors mit Sterinen S. 364. — c) Vorkommen in anderen Naturprodukten S. 365. — d) Aufspaltung des aktiven Prinzips in 2 Komponenten S. 366. — Komponente I: Identifizierung mit Ergosterin S. 366. — Quantitative Ergosterinwirksamkeit S. 368. — Ersatz des Ergosterins durch: Cholesterin S. 368. — Vigantol S. 368. — Komponente II: Faktor U S. 369.
V. Die Frage der Vitaminspeicherung 371
VI. Heilung von B_1- und B_2-Avitaminosen 372
VII. Histologische Untersuchungen 372
VIII. Zur Frage des Wachstumsvitamins 374
IX. Zusammenfassung der an *Tribolium confusum* gewonnenen Ergebnisse 374

[1] Gefördert von der Dr. ARNOLD HIRT-Stiftung und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Seite
Oryzaephilus surinamensis 376
Nachweis: 1. Des B_1- und B_2-Bedarfs S. 378. — 2. Eines weiteren benötigten wasserlöslichen Faktors. S. 378. — 3. Des Ergosterinbedarfs S. 378.
Zusammenfassung der Ergebnisse 379
Sitodrepa panicea 379
Blattella germanica 380
C. Allgemeiner Überblick 381
D. Literatur 382

A. Einleitung und historischer Überblick.

Die experimentelle Richtung in der Symbioseforschung der letzten Jahre hat sich vor allem die Klärung der physiologischen Bedeutung der intrazellulären Symbionten zum Ziel gesetzt. Durch Sprengung des symbiontischen Systems versuchte man die beiden so innig miteinander verquickten Partner zu trennen. Aus den dabei sich ergebenden Ausfallserscheinungen zog man Schlüsse auf die physiologische Bedeutung der pflanzlichen Gäste.

Aschner (1932 und Aschner und Ries 1933) entfernte auf operativem Wege die Mycetome der Kleiderlaus. Schwere Ausfallserscheinungen, welche bei den Larven zum Tode führten, traten im Gefolge des Verlustes der symbiontischen Bakterien ein. Koch (1933) gelang es, durch Sterilisieren der Eischale symbiontenfreie *Sitodrepa panicea* zu erhalten, und auch hier waren die ihrer symbiontischen Hefen beraubten Tiere, die schwere Wachstumsstörungen zeigten, dem Tode geweiht.

Zusatz von Bierhefe, Hefeextrakten oder Weizenkeimlingen zur Grunddiät kompensierte bei *Sitodrepa* vollkommen den Symbiontenverlust, und auch bei *Pediculus vestimenti* vermochten Zusätze von Hefeauszügen oder Bakterienfiltrate zu der rektal verabreichten Nahrung die Ausfallserscheinungen aufzuheben oder wenigstens weiter hinauszuschieben.

Daraus zogen die genannten Autoren den Schluß, daß die Symbionten unspezifische, lebensnotwendige Stoffe erzeugen, die schon in geringsten Dosen wirksam sind, und weitere Extraktions- und Fütterungsversuche gaben zu der Annahme Berechtigung, daß es sich dabei um die Vitamine der B-Gruppe handelt (Koch 1933).

Versuche, die in neuerer Zeit mit Reinkulturen isolierter Symbionten angestellt wurden, haben eine weitere Stütze für diese Annahme erbracht. Erste orientierende Versuche, welche Hobson mit den von Wigglesworth (1936) isolierten Bacillen aus dem Mitteldarmlumen der Wanze *Rhodnius prolixus* angestellt hat, deuten darauf hin, daß diese Mikroorganismen B-Vitamine produzieren. Die gleiche Feststellung machte Getzel (1936) an Reinkulturen von *Geotrichoides pierantonii*, der symbiontischen Hefe von *Icerya purchasi*.

Eine genauere Analyse des wirksamen Prinzips dieser Mikroorganismen steht noch aus. Bei der Schwierigkeit der Reinkultur der Symbionten stehen ihr heute noch große Hindernisse im Wege. Aber wir wissen, daß jene Stoffe unspezifischer Natur sind und auch in Bierhefe und Weizenkeimlingen vorkommen. Bierhefe bzw. deren Extrakte, war ja in allen Fällen sicher wirkendes Kompensationsmittel für die Ausfallserscheinungen bei Symbiontenverlust.

Bei der Inangriffnahme dieser Arbeit waren daher mehrere Ziele ins Auge zu fassen. Es galt vor allem eine genaue Analyse aller für das Wachstum und die Lebenserhaltung der Insekten nötigen Vitamine und Wachstumsfaktoren der Hefe durchzuführen.

Eine weitere Aufgabe bestand darin, günstige Testobjekte aus dem Insektenreich zu finden, welche die langwierigen und kostspieligen Testmethoden mit Säugetieren und Vögeln abkürzen und verbilligen könnten. Sind wir doch heute gerade bei den Vitaminen und anderen Wirkstoffen, die wir nicht oder nur schwierig chemisch nachweisen und synthetisieren können und vor allem bei denen, deren Natur noch völlig unklar ist, auf den biologischen Test angewiesen. So z. B. schlägt W. Robbins (1938) auf Grund der verschiedenen Reaktionsweise gewisser Pilzarten auf das Vitamin B_1 oder seine beiden chemischen Komponenten Pyrimidin und Thiazol ein Bestimmungsverfahren für das natürliche Vorkommen dieser Körper vor.

Um die Aufklärung des Vitaminbedarfs bei Insekten haben sich schon verschiedene Forscher bemüht. Die meisten Arbeiten liegen aber in einer Zeit, in der man noch zu wenig die einzelnen Vitamine unterscheiden konnte. So z. B. kennen wir heute bereits 7 wasserlösliche in der Hefe vorkommende B-Vitamine (B_1—B_7). Diese Autoren sprachen aber immer, wenn es sich um einen wasserlöslichen Hefefaktor handelte, vom Vitamin B. Die einen gingen bei ihren Arbeiten von gereinigter synthetischer Grundkost aus und setzten Hefe oder Hefeextrakte zu, wie z. B. Bacot und Harden bei ihrer Arbeit über *Drosophila*. Andere extrahierten die normale Kost mit verschiedenen Lösungsmitteln. Gediehen dann die Tiere nicht, so schlossen sie — wie z. B. Richardson in einer Arbeit über *Ephestia kühniella* — daraus, daß die für die betreffenden Tiere nötigen Vitamine durch die Extraktion der Nahrung entzogen worden sind. Welche Vitamine im einzelnen dabei entfernt wurden, ließ sich nur vermuten.

Weit mehr können wir schon der Arbeit Hobsons (1935) über den Einfluß der Wachstumsfaktoren auf die Entwicklung der Fliege *Lucilia sericata* entnehmen. Hobson findet folgende Faktoren, die für das Tier zum Wachstum notwendig sind. 1. Eine Substanz, die nicht in wässerigen oder alkoholischen Hefeextrakten vorkommt, sondern in löslicher Form in Autolyseprodukten der Hefe enthalten ist. 2. Einen Faktor, der mit Vitamin B_1 identisch sein dürfte und 3. Faktoren, die in autoklaviertem

Marmite vorkommen. Bei weiteren Versuchen konnte HOBSON feststellen, daß diese Fliegenlarven einen fettlöslichen Wachstumsfaktor brauchen und daß dieser Faktor mit Cholesterin identisch ist.

Die wichtigste Arbeit auf diesem Gebiete ist zweifellos die Studie des Holländers VAN'T HOOG über den Vitaminbedarf bei *Drosophila*. Sie ist vielleicht überhaupt die einzige Arbeit, die dem derzeitigen Stand der modernen Vitaminforschung gerecht wird. VAN'T HOOG gibt auch eine umfassende Literaturzusammenstellung, auf die ich — um Wiederholungen zu vermeiden — hier verweise. Er ging nun als erster daran, bei *Drosophila* eine genauere Analyse durchzuführen, um festzustellen, welche Faktoren für das Gedeihen dieses Insekts nötig seien.

Vor ihm hatten schon BACOT und HARDEN (1922) in einer synthetischen Diät aus gereinigtem Casein, Stärke, Salzen, Zucker und Butterfett oder Salatöl unter Zusatz von Hefeextrakt ein geeignetes Kulturmedium für Drosophila gefunden und aus den Ergebnissen ihrer Versuche geschlossen, daß die wasserlöslichen B-Vitamine der Hefe für *Drosophila* nötig seien.

VAN'T HOOG ging ebenfalls von einer synthetischen Kost aus. Diese bestand aus peptonisiertem Casein, Stärke, Rohrzucker, Salatöl (oder seiner unverseifbaren Komponente), Agar-Agar, Salzen und Wasser. Durch Zusatz der Salze wurde im Futter ein p_H von etwa 3,5 hergestellt. Die Tiere gediehen in diesem Medium gut, vorausgesetzt, daß Hefe zugegeben wurde. Durch das stark saure, baktericid wirkende Medium wurden die für ein aseptisches Arbeiten unbedingt erforderlichen Voraussetzungen geschaffen. VAN'T HOOG sterilisierte die zum Ansetzen der Zuchten verwendeten Eier äußerlich mit einer alkoholischen Chloraminlösung, um dadurch eine Bakterieninfektion des gleichfalls sterilen Kulturmediums zu verhindern. Auf diese Weise konnte eine eventuelle Vitaminsynthese durch Bakterien des Futters ausgeschaltet werden. Daß eine Vitaminsynthese durch Bakterien stattfinden kann, hatten mehrere Autoren bewiesen (BLECHDEL-HONEYWELL-DUTCHER-KNUTSEN, SCHEUNERT-SCHIEBLICH 1928, 1923 und 1927). Weiterhin glaubt WIGGELSWORTH vermuten zu müssen, daß die symbiontischen Bakterien von *Rhodnius prolixus* als Vitaminquelle für den Wirt eine Rolle spielen. Auch die Erscheinung der Refektion der Ratten, die FRIDERICIA entdeckt hatte, beruht ja auf der Produktion von Vitamin B_1 durch ein Virus, das durch Kochen zerstört wird (BOMSKOV 1935).

Bei weiteren Versuchen VAN'T HOOGs zeigte sich, daß das Salatöl (oder das Butterfett), wenn Hefeextrakte statt Hefe gegeben wurden, in der Grunddiät vorhanden sein mußte. Es konnte aber auch durch seine unverseifbare Fraktion ersetzt werden, und schließlich stellte sich heraus, daß das wirksame Prinzip der unverseifbaren Komponente Ergosterin ist. Statt Ergosterin konnten auch eine Reihe anderer Sterine verfüttert werden. Z. B. Cholesterin, Stigmasterin, Dihydrocholesterin. Am wirksamsten war Ergosterin, während Vitamin D-Präparate inaktiv waren.

Als Vitamine der B-Gruppe fand VAN'T HOOG die Vitamine B_1 (Aneurin) und B_2 (Laktoflavin) für Wachstum und Entwicklung von *Drosophila* erforderlich. Dazu kommt noch mindestens ein weiterer wasserlöslicher Faktor der Hefe, der auch für *Drosophila* nötig zu sein scheint, der aber von VAN'T HOOG nicht näher untersucht wurde.

Auf weitere methodische Einzelheiten dieser Arbeit werde ich bei der Darstellung meiner eigenen Befunde noch eingehen.

Diesen Ergebnissen VAN'T HOOGS widersprechen die Angaben des Franzosen LAFON (1937). Nach ihm sollen weder Vitamin A noch D noch E noch die Vitamine B_1, B_2 oder C für *Drosophila* nötig sein.

Weiterhin muß uns hier noch eine Arbeit von TRAGER interessieren. Dieser Autor berichtet von der erfolgreichen Aufzucht von Mosquitolarven auf einem sterilen Medium, das außer autoklaviertem Leberextrakt auch autoklavierte Hefe als Entwicklungsfaktoren enthält. Er spricht weiterhin von einem besonders wichtigen Hefefaktor, den er mit A bezeichnet und von dem er einige Eigenschaften aufzählt. Dieser Faktor ist leicht löslich in Wasser und 70- und 85%igem Alkohol, unlöslich in 95%igem Alkohol und in Äther. Er wird durch Fullererde und durch Tierkohle adsorbiert, diffundiert durch Collodiummembran und ist beständig in schwach saurer Lösung, wird aber durch einstündiges Kochen mit 0,5 n Säure oder durch 24-stündiges Stehen in 0,5 n Alkalilösung bei Zimmertemperatur zerstört.

Weiterhin sei noch eine Arbeit über die Entwicklungsfaktoren der Kleidermotte *(Tineola biselliella)* kurz referiert. Die Autoren dieser Arbeit, MARY, F. CROWELL und C. M. MCCAY stellten fest, daß die Kleidermotte außer Casein Laktalbumin zur Entwicklung braucht, außerdem ist ein Hefekonzentrat, das die B-Vitamine enthält, nötig, während Fette und fettlösliche Vitamine entbehrt werden können.

Zu ganz andersartigen Ergebnissen kommt der Italiener GUISEPPE DI MARIA mit seinem Versuchsobjekt der Larve von *Sarcophaga*. Dieses Tier verwertet zwar den B_2-Faktor der Hefe, kann jedoch die Vitamine entbehren. Für das Gedeihen der Larve sollen nur Enzyme mit hydrolytischer Wirkung nötig sein. Im Gegensatz zu den anderen Autoren behauptet er, daß die Bakterien im Kulturmedium nicht durch Vitaminsynthese, sondern durch ihre hydrolytische Tätigkeit auf die Larvenentwicklung im günstigen Sinne wirken. Doch glaube ich, daß gerade bei diesen Versuchen sich schwer eine reinliche Scheidung zwischen der Wirksamkeit hydrolytisch spaltender Enzyme und lebensnotwendiger Vitamine durchführen läßt und so DI MARIAS Beweisführung nicht stichhaltig genug ist.

B. Spezieller Teil.

Ein klares Bild über die für die Insektenentwicklung tatsächlich nötigen Wachstumsfaktoren kann man aus diesen teils ungenauen, teils

einander widersprechenden Angaben nicht gewinnen. So erschien mir eine abermalige Inangriffnahme dieses Fragenkomplexes besonders reizvoll und aussichtsreich.

Nicht leicht war es zunächst, das geeignete Versuchsobjekt zu finden, das alle für die erfolgreiche Durchführung derartiger Untersuchungen nötigen Bedingungen erfüllte, es sind dies:

1. rasche Generationenfolge bei möglichst gleichmäßiger Entwicklung;
2. große Vermehrungsrate;
3. gute Aufzuchtmöglichkeit bei möglichst einfach zusammengesetzter praktisch steriler Diät;
4. symbiontenfreie Tiere.

Ephestia kühniella Zell.

Als ich mit meiner Arbeit begann, hatte ich noch keine Kenntnis von den van't Hoogschen Ergebnissen. Ich versuchte zunächst mit der Mehlmotte, *Ephestia kühniella,* zu Ergebnissen zu kommen. Frisch geschlüpfte Larven wurden in synthetischen Diäten, die aus Witte-Pepton oder vitaminfreiem Casein, vitaminfreier Reisstärke, Erdnußöl und Osborne-Mendel-Salzgemisch bestanden und denen als Vitaminquelle Hefe und Hefeextrakte zugesetzt wurden, aufgezogen. Es zeigte sich aber, daß selbst bei günstiger Kost die einzelnen Larven noch sehr verschiedene Entwicklungsdauer hatten. Außerdem war die Entwicklungszeit von 4—6 Wochen bei 31° noch von zu langer Dauer, um die tastenden Versuche über Vitaminwirksamkeit bei Insekten in möglichst kurzer Zeit durchzuführen. Es mußte hier an einem günstigeren Objekt mit wesentlich kürzerer Entwicklungsdauer eine gewisse Vorarbeit geleistet werden. War es doch nötig, erst eine geeignete Methodik auszuarbeiten und dabei vor allem die richtige Dosierung der Vitamine zu erproben. Wünschenswert erschien mir ferner die Wahl eines Tieres, das die gleichen Ernährungsgrundlagen hat wie *Sitodrepa panicea,* da ich die Absicht hatte, meine Versuche später auf dieses Objekt auszudehnen.

Tribolium confusum Duv. *(Tenebrionidae).*

Geeigneter als *Ephestia* erschien mir deshalb der Reismehlkäfer „*Tribolium confusum*", auf den mich Koch aufmerksam gemacht hat. Er hat eine kürzere Entwicklungszeit und sollte nach Sweetman und Palmer besonders gut auf Vitamin B-Mangel reagieren. Mit „B" bezeichneten diese Autoren — wie auch die anderen zu ihrer Zeit — wässerige oder alkoholische Extrakte aus Hefe oder Weizenkeimlingen. Sie behaupteten ferner, daß Zugabe von Fett, mit oder ohne Vitamin A, das Wachstum zu beschleunigen schien.

In ihrer Methodik gingen sie so vor, daß sie frisch geschlüpfte Larven in die Versuchskost einsetzten, die sie zunächst durch Extraktion von Weizenkeimlingen (wheat-embryo), ähnlich den Versuchen Richardsons mit *Ephestia,* herstellten und dann die Extrakte wieder zum Extrahierten zusetzten. In späteren Versuchen gingen sie von einer synthetischen Grundkost aus. Sie bestand aus folgenden Stoffen:

Eiweiß . .	28% Casein	Fett . .	3% Crisco (Baumwollsamenöl) oder
Kohlehydrat	65% Dextrin		3% Ätherextrakt aus Weizenkeimlingen.
Salze . . .	4% Osborne-Mendel-Salzgemisch		

Zu dieser Kost wurden Hefe- und Weizenextrakte zugesetzt. Weiterhin wurde auch der Versuch gemacht, durch Extraktions-, Adsorptions- und Fällungsverfahren ein Konzentrat des sog. Vitamins B herzustellen. Ferner wurden auch Getreidekörner auf Vitamin B-Gehalt untersucht. Dabei zeigte sich, daß im Embryo der Körner und in dem ihm benachbarten Teil des Endosperms auch Vitamin B zu finden war, da die Tiere, die diese Teile des Kornes in der Nahrung als Zusatz erhielten, gut gediehen.

In der Diskussion dieser Arbeit wird dann festgestellt, daß *Tribolium confusum* wahrscheinlich fettlösliche Substanzen entbehren kann. Die Frage des Vitamin A-Bedarfes bleibt ungeklärt.

I. Material und Methode.

Einige Mühe bereitete es, in den Besitz des Tiermaterials zu gelangen. An den hiesigen Instituten, in den Mühlen Breslaus und in der Umgebung der Stadt sowie durch Vermittlung der Landesbauernschaft waren nirgends Tribolien zu erhalten. Die Tiere, die schließlich zu den Versuchen verwendet wurden, stammten aus Kulturen, die mir Herr Prof. Dr. Hase von der Biologischen Reichsanstalt zur Verfügung stellte. Dank der schnellen Entwicklungszeit dieser Insekten, war ich bald im Besitz von einer für die Versuche ausreichenden Menge an Tiermaterial. Die Stammkulturen erhielten als Nahrung ein Gemisch von Mehl und Haferflocken und wurden zunächst, um möglichst viel Imagines zu erzeugen, im Thermostaten bei 31,5°, später bei Zimmertemperatur gezüchtet.

Von Herrn Oberregierungsrat Dr. F. Zacher erhielt ich freundlicherweise noch Tiermaterial von *Tribolium navale*. Diese Tenebrionidenart wurde aber bisher zu Versuchen nicht benutzt.

Von *Tribolium confusum* hatte ich also stets genügend Versuchsmaterial zur Hand.

Die Methodik der Eigewinnung ist bei Sweetman und Palmer ebenfalls angegeben. Die Imagines wurden in Mehl gesperrt und nach 24 Stunden wurden die mit Mehlpartikelchen verklebten Eier mit einem Doppelsieb von den Käfern und vom Nährsubstrat abgesondert.

Bei meinen Versuchen hielt ich alle Tiere in einem Thermostaten[1], der eine Temperatur von 31,5° hatte und der eine Luftfeuchtigkeit von 70—75% aufwies. Die Feuchtigkeit wurde durch Schälchen, die mit gesättigter Kochsalzlösung gefüllt und im Thermostaten verteilt aufgestellt wurden, auf gleicher Höhe gehalten.

Die Gewinnung von frisch geschlüpften Larven vollzog sich nun so, daß ich etwa 100 Tiere in etwa 5 g Mehl sperrte und nach 24 Stunden die Eier absiebte. Nach weiteren 5 Tagen waren die jungen Larven geschlüpft und konnten nun ausgelesen und in die Versuchsdiäten eingesetzt werden. Von je 100 Käfern erhielt ich täglich 30—40 Larven.

Im Verlauf und nach Abschluß der Versuche wurden die Larven jeweils ausgemessen und auf diese Weise das Wachstum kontrolliert. Die Resultate dieser Arbeit wurden an Hand eines sehr umfangreichen Materials (etwa 8000 Tiere) gewonnen.

Die Fütterungsversuche wurden in Tuben von 25 mm Durchmesser und 80 mm Höhe ausgeführt. Jede Tube enthielt 1,5 g Nahrung, wurde mit 12 frisch geschlüpften Tieren besetzt und mit feiner Gaze verschlossen. Die Zahl 12 wurde gewählt, weil beim Einsetzen oder bei anderen Manipulationen meist im Durchschnitt 2 Tiere zu Schaden kamen und beim Resultat aus der Reihe oder ganz ausfielen. 10 Tiere blieben also immer für das Ergebnis.

[1] Die Deutsche Forschungsgemeinschaft stellte für die Untersuchungen 2 Inkubatoren zur Verfügung.

Als Grunddiät für meine Versuche stellte ich folgende Kost auf:

Eiweiß	: Casein (vitaminfrei) . . 15%	Fett	: Arachisöl 3%
Kohlehydrat	: Reistärke (vitaminfrei) . 70%	Wasser	: 7%
Salze	: Osborne-Mendel-Salzgemisch[1] 5%		

Diese Diät entspricht quantitativ — keinesfalls aber qualitativ — etwa der durchschnittlichen Zusammensetzung der Cerealien. Die Kost ist bis auf das Arachisöl, das ja auch als „vitaminarm" bekannt ist, vitaminfrei. Die vitaminfreien Präparate, Casein und Reisstärke, bezog ich von der Firma Merck (Darmstadt), ebenso ließ ich das Osborne-Mendel-Salzgemisch, das ich anfangs selbst herstellte, später von dort kommen. Die Diät, die bis auf das Erdnußöl einwandfrei vitaminfrei ist, nenne ich kurz Mangeldiät (abgekürzt Mgdt.). Es wird in der Folge noch zu beweisen sein, daß, eventuell im Erdnußöl vorhandene, bei *Tribolium* wirksame Vitamine nicht übersehen werden können.

II. Der Einfluß verschiedener Diäten auf die Entwicklung von *Tribolium confusum*.

Im folgenden beginne ich mit der Beschreibung der ersten orientierenden Versuche. Zunächst sei angeführt, daß die Larvalentwicklung von 12 Tieren in 1,5 g Weizenmehl bei der Temperatur und Feuchtigkeit des verwendeten Thermostaten etwa 20—23 Tage dauert, d. h. also 20—23 Tage nach dem Einsetzen der frisch geschlüpften Larven in das Mehl sind die Tiere verpuppt. Vor der Verpuppung haben die Larven, die frisch geschlüpft etwa 1,5 mm groß sind, eine Größe von 6,5—7,5 mm. Es kommen aber auch Tiere bis 8 mm Größe vor. Für den Zeitpunkt der Verpuppung spielt nicht die Größe, sondern der Entwicklungsgrad einer Larve die ausschlaggebende Rolle. Die Länge der Puppen schwankt demnach auch etwas zwischen 4 und 4,5 mm.

Dieselbe Entwicklungsgeschwindigkeit wie mit Weizenmehl wurde auch mit der Mangeldiät unter Zusatz von 5% Trockenhefe[2] (Saccharomyces cerevisiae) erreicht, während in der Mangeldiät ohne Hefezusatz die Tiere überhaupt nicht wuchsen.

Zur Prüfung des Fettbedarfs von *Tribolium* wurde fettfreie Mangeldiät mit 5% erschöpfend mit Äthyläther extrahierter Trockenhefe verfüttert. Die Entwicklung verlief völlig normal, d. h. also, daß *Tribolium*

[1] Das Osborne-Mendel-Salzgemisch wird durch Lösen, Eindampfen und Zerreiben folgender Stoffe hergestellt:

$CaCO_3$	134,8 g	Zitronensäure	111,1 g + 1,5 l H_2O		
Na_2CO_3	34,2 g	Ferrizitrat	6,4 g + 1,5 l H_2O		
H_3PO_4	103,2 g	KJ	0,02 g	K-Al-Alaun	0,0245 g
H_2SO_4	9,2 g	NaF	0,248 g	$MgCO_3$	24,2 g
K_2CO_3	143,3 g	HCl	53,4 g	$MnSO_4$	0,079 g

[2] Die bei den Versuchen verwendete Trockenhefe war freundlicherweise von den Cenoviswerken München zur Verfügung gestellt worden.

keinen Bedarf an Fetten und fettlöslichen Stoffen hat, die mit Äthyläther aus Hefe extrahierbar sind. Andererseits wurde mit dem Versuch bewiesen, daß Erdnußöl keinen Stoff enthält, der für *Tribolium* lebensnotwendig ist und der nicht auch in Hefe vorkommt. Der Erdnußölgehalt der Mangeldiät ist also nur dann zu berücksichtigen, wenn in der Hefe nichtwasserlösliche Stoffe vorkommen, die für die *Tribolium*-entwicklung erforderlich sind und die eventuell im wasserunlöslichen Teil der Hefe und im Arachisöl gleichzeitig vorkommen können.

Obwohl nun bewiesen war, daß das Erdnußöl für *Tribolium* als Fett unwichtig ist, wenn die Hefefaktoren zugegen sind, wurde es in der Mangeldiät beibehalten. Durch diesen Fettgehalt erhielt die Diät eine handliche krümmelige Konsistenz, während sie ohne Öl staubig fein war und deshalb die Gefahr bestand, daß die Stigmen der Larven verstopft würden. Spätere Versuche mit fettfreier Diät zeigten aber, daß diese Befürchtungen nicht berechtigt waren, da auch in den staubig feinen Diäten keine Wachstumshemmung zu beobachten war, die auf die Verstopfung der Stigmen hätte zurückgeführt werden können.

Einzelprüfung der anderen Komponenten der Mangeldiät.

Um zu prüfen, ob auch alle Bestandteile der Mangeldiät von den jungen Larven aufgenommen werden, war es noch erforderlich, die folgenden Versuche durchzuführen. Für besonders nötig hielt ich die Kontrolle, ob die Tiere das Casein aufnehmen. Es lag zwar gepulvert vor, die einzelnen Stückchen erschienen aber im Vergleich zu den jungen Larven immer noch ziemlich groß. Es konnte ja so sein, daß das Casein nicht gefressen wurde, sondern die 5% Hefe, die zugesetzt wurden, konnten den Tieren als Eiweißquelle genügen; ein anderer Versuch zeigte nämlich, daß auch die Larven in reiner Trockenhefe gut gediehen, wenn auch die Verpuppung 3—4 Tage später als in reinem Mehl erfolgte.

In einer Versuchsreihe untersuchte ich diese Verhältnisse genauer, und zwar gab ich nicht 5% Hefe, sondern nur 1% Hefe zur fettfreien Mangeldiät, um eine Verwendung der Hefe als Hauptnährstoff (Eiweiß, Fett oder Kohlehydrat) möglichst zu verhindern. Die Tiere gediehen auch hier ganz gut, die Verpuppung trat verzögert am 25.—27. Tage ein.

In einem weiteren Versuch wurde nun fett- und caseinfreie Mangeldiät mit Zusatz von 1% Hefe gefüttert. Die Tiere gediehen auch gut, wuchsen aber etwas langsamer und gelangten erst nach 33—36 Tagen zur Verpuppung. Damit war augenscheinlich erwiesen, daß Casein aufgenommen wird; in der caseinhaltigen Diät trat ja die Verpuppung schon eher ein.

Interessant war weiterhin ein Versuch, in welchem auch die Mineralsalze ausgeschaltet wurden und der also nur mit vitaminfreier Stärke und 1% Hefe durchgeführt wurde. Hier wurde, obwohl die Larven 5—7 mm groß wurden, auch nach 40 Tagen noch keine Verpuppung

beobachtet. Die Mineralsalze spielen also, wie nicht anders zu erwarten war, für den Ablauf der Entwicklung von *Tribolium* eine entscheidende Rolle.

Gleichzeitig wurde der Vollständigkeit halber auch ein Versuch, in dem Mangeldiät ohne Stärke + 1% Hefe verfüttert wurde, durchgeführt. Es war von vornherein anzunehmen, daß die Tiere nicht gedeihen. Es ist ja bekannt, daß ein großer Eiweißüberschuß in der Nahrung giftig wirkt. Der Entzug der Kohlehydrate muß sich ja gerade bei einem Kohlehydratspezialisten, wie es zweifellos *Tribolium* ist, besonders stark auswirken, sind doch die Kohlehydrate auch die wichtigste Energiequelle für das Wachstum (Glanzmann 1938).

Durch alle diese Versuche waren nun die Grundlagen für die eigentlichen Arbeiten über den Vitaminbedarf bei *Tribolium* geschaffen.

III. Untersuchung des Verhaltens der Tiere gegen mit Vitaminpräparaten versetzte Mangeldiät.

Als nächstes Ziel stellte ich mir nun die Aufgabe, zunächst einmal die heute im Handel befindlichen Vitaminpräparate [1] im *Tribolium*-Versuch zu prüfen. Ich hatte schon kurz erwähnt, daß Tiere, die in die Mangeldiät gesetzt wurden, kaum ein Wachstum zeigten. Sie lebten mitunter 70 Tage und länger; vereinzelt gefundene Exuvien wiesen darauf hin, daß sich die Tiere noch etwas entwickelten, aber sie blieben so klein, wie sie eingesetzt wurden (1,4—1,7 mm) oder zeigten höchstens einen kleinen Zuwachs bis zu 2 mm.

Mir standen folgende Präparate zur Verfügung: Von den fettlöslichen Vitaminen die Präparate

1. Vogan . . . . . als Vitamin A
2. Vigantol . . . . . „ „ D
3. Aus Weizenkeimöl gewonnenes Konzentrat . „ „ E

Von den wasserlöslichen Vitaminen die Präparate

4. Betaxin . . . . . als Vitamin B_1
5. Biologisch standardisiertes Konzentrat von Laktoflavin „ „ B_2
6. Cantan in Tabletten . . . . . „ „ C.

Es wurde nun versucht, durch Zusatz der einzelnen Vitamine in verschiedener Dosierung und durch kombinierte Zugabe mehrerer oder aller mir zur Verfügung stehender Vitaminpräparate zur Mangeldiät herauszufinden, auf welche dieser Vitamine die *Tribolium*-Larven reagieren. In keiner dieser Versuchsreihen war Wachstum oder irgendwelche Andeutung von Metamorphose festzustellen. Es war höchstens eine toxische Wirkung bei zu hohen Gaben zu bemerken. Die Tiere starben in diesen Fällen bald nach dem Einsetzen.

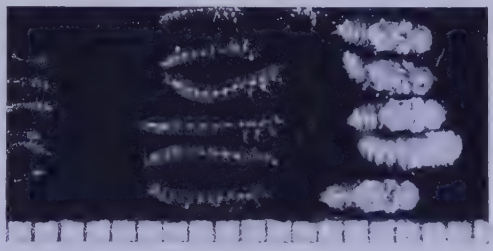
[1] Der Breslauer Vertretung der Firma Bayer, welche mir freundlicherweise die für diese Versuche nötigen Vitaminpräparate bereitwilligst zur Verfügung stellte, sei auch an dieser Stelle noch einmal verbindlichst gedankt.

IV. Die Analyse der Hefefaktoren.

Auf die eben beschriebene Art und Weise konnte ich also nicht zum Ziel kommen. Ich mußte versuchen in der Hefe, die ja, wie die ersten Versuche gezeigt hatten, alle Faktoren, die für *Tribolium* nötig sind, enthält, einzelne Komponenten zu zerstören, um ihre Notwendigkeit zu beweisen.

Aufspaltung der Hefe in wasserlösliche und wasserunlösliche Komponenten.

Trockenhefe wurde mit heißem Wasser extrahiert, um eventuell wasserlösliche und nicht wasserlösliche bei *Tribolium* wirksame Faktoren festzustellen. Der nicht in Wasser lösliche Teil der Hefe wurde noch mehrmals (7—8mal) erschöpfend mit viel heißem Wasser extrahiert, um alle wasserlöslichen Teile zu entfernen, und getrocknet, während der wasserlösliche Teil eingedampft und im Trockenschrank bei 40° getrocknet wurde.



a b c

Abb. 1 a—c. 28 Tage alte Tiere gefüttert mit: a Mgdt. + 4% wasserunlöslicher Teil der Hefe. b Mgdt. + 4% Hefeextrakt. c Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe. Die Teilstriche des Maßstabes auf dieser und auf allen folgenden Abbildungen zeigen eine Millimetereinteilung an. Dazu ist aber zu bemerken, daß sich die Tiere bei der Äthernarkose, die für das Photographieren der Tiere nötig ist, ziemlich stark kontrahieren, so daß man nicht ohne weiteres die wahre Größe der Tiere mit diesem Maßstab messen kann.

Nun wurden folgende Versuche angesetzt:

1. Mgdt. + 4% Hefeextrakt.

2. Mgdt. + 4% wasserunlöslicher Teil der Hefe.

3. Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe.

Nach 18 Tagen lag folgendes Ergebnis vor:

Versuch 1: Larven 3 mm groß.

Versuch 2: Larven nicht gewachsen (etwa 2 mm).

Versuch 3: Larven etwa 6 mm groß.

Nach 28 Tagen zeigte sich das Bild, wie es die Abb. 1 vor Augen führt.

Auch die Tiere im Versuch 1, die nur Hefeextrakt bekamen, kamen zur Verpuppung, aber erst nach 42—47 Tagen.

Das Ergebnis dieser Reihe ist nun augenscheinlich so zu deuten, daß zunächst mindestens ein wasserlöslicher und mindestens ein wasserunlöslicher Faktor für die Entwicklung von *Tribolium* unentbehrlich sind.

Daß die Tiere von Versuch 1, die nur Hefeextrakt bekamen, zur Verpuppung gelangten, dürfte folgendermaßen zu erklären sein. Der wässerige

Hefeextrakt konnte trotz mehrfachen Filtrierens nicht als klare Lösung erhalten werden. Es blieb eine kolloidale Trübung in der Lösung bestehen, die, nach den Versuchsergebnissen zu urteilen, Spuren des wasserunlöslichen Faktors enthalten mußte, die genügten, wenn auch erst nach längerer Zeit, Wachstum, Verpuppung und schließlich auch Umwandlung zur Imago hervorzurufen.

Die Puppenruhe dauerte übrigens bei allen Versuchen, die zur Verpuppung führten, nur 6—7 Tage; ganz gleichgültig, ob normale Kost gefüttert wurde oder ob durch irgendeinen Mangel in der Kost die Larvenperiode künstlich verlängert wurde. War erst das Puppenstadium erreicht, so trat auch spätestens am 7. Tage Umwandlung zur Imago ein.

Analyse der wasserlöslichen Komponente der Hefe.

Nach diesem Ergebnis konnte ich daran gehen, die einzelnen Komponenten der wasserlöslichen Fraktion auf ihre Wirksamkeit hin zu prüfen. Von den verschiedenen Faktoren der B-Gruppe, die bisher in der Hefe nachgewiesen wurden, nahm ich zuerst die Prüfung auf B_1 in Angriff. Vitamin B_1 (Aneurin oder Antiberiberivitamin genannt), ist eines der am besten untersuchten Vitamine, dessen Eigenschaften auch genau bekannt sind. Wir wissen z. B., daß es ziemlich hitzestabil ist und erst durch Autoklavieren zerstört wird.

Zur ersten Orientierung wurden zunächst etwa 5 g Hefe nur 3 Stunden bei 120° und 1,25 Atm. Überdruck autoklaviert. Mit dieser Hefe wurden folgende Versuche angesetzt:

1. Mgdt. + 5% 3 Stunden autoklavierte Hefe.
2. Mgdt. + 5% 3 Stunden autoklavierte Hefe + etwa 100 γ B_1.

Nach 18 Tagen lag folgendes Ergebnis vor: Die Tiere in Versuch 1 waren nicht gewachsen, die Tiere mit Zusatz von Vitamin B_1 waren etwa 4,5 mm groß, und nach weiteren 13 Tagen erfolgte die Verpuppung, während die Tiere des Versuches 1 nach dieser Zeit höchstens 2,5 mm groß, meist aber tot waren.

Damit war bewiesen, daß für *Tribolium* der Bedarf für Vitamin B_1 besteht. Das war an sich vorauszusehen, wenn man die Angaben in der Literatur berücksichtigte, die besagten, daß Vitamin B_1 für den Kohlehydratstoffwechsel der Tiere nötig ist und daß mit einer Zunahme der Kohlehydrate in der Nahrung eine Zunahme des B_1-Bedarfs Hand in Hand geht (Stepp-Kühnau-Schröder, von Euler u. a.). Kohlehydrate aber sind in der natürlichen Nahrung die Hauptnährstoffe dieses Tieres.

Daraus, daß autoklavierte Hefe durch Zusatz von Vitamin B_1 für *Tribolium* wieder vollwertig wurde, d. h. also, daß sie dann wieder alle für *Tribolium* nötigen Stoffe enthält, ließ sich der Schluß ziehen, daß die thermolabilen Vitamine B_3 und B_4 für dieses Tier keine Rolle spielen.

Weiterhin sei an dieser Stelle erwähnt, daß auch das wasserlösliche, thermolabile Vitamin C, das nach RUDY auch in der Hefe vorkommen soll, nicht in der Nahrung für *Tribolium* enthalten sein muß. Es ist ja bekannt, daß die meisten Tiere Vitamin C selbst synthetisieren und deshalb nicht in der Nahrung benötigen. Von den gebräuchlichen Laboratoriumstieren hat nur das Meerschweinchen Bedarf an C-Zufuhr in der Nahrung, während Ratte, Kaninchen, Taube und Huhn ohne C-Zufuhr auskommen.

An dieser Stelle sei kurz erklärt, wie sich überhaupt bei *Tribolium*-larven Mangelerscheinungen bei Fehlen eines Faktors bemerkbar machen. Die Dinge liegen hier folgendermaßen: Fehlt auch nur einer der lebenswichtigen Faktoren vollkommen, so findet überhaupt kein Wachstum statt. Bei steigender Zufuhr des fehlenden Faktors erfolgt dann eine Besserung der Wachstums- und Entwicklungsbedingungen, d. h. Wachstum und Entwicklung werden bis zur Verabreichung der Optimaldosis beschleunigt, während bei Überdosierung Wachstumshemmung oder Tod eintritt.

Nach den ersten Versuchen, die zum Nachweis des B_1-Bedarfs führten, wurde nochmals Hefe, und zwar diesmal 7 Stunden autoklaviert. Dadurch wurde erreicht, daß bei Zusatz von 5% autoklavierter Hefe zur Mangeldiät überhaupt kein Wachstum stattfand, während beim Versuch

Mgdt. + 5% 3 Stunden autoklavierte Hefe

noch ein schwaches Wachstum stattgefunden hatte, da durch das 3stündige Autoklavieren der Hefe nicht alles B_1 restlos zerstört worden war.

Zur Feststellung des B_1-Optimums wurden nun die Versuche angesetzt, die in der Tabelle 1 dargestellt sind.

Grundkost: Mgdt. + 5% 7 Stunden autoklavierte Hefe.

Tabelle 1.

		Wachstumsergebnis nach	
		17 Tagen	25 Tagen
Zur Grundkost 1.	+ 100 γ B_1	4 mm	5 mm
Zur Grundkost 2.	+ 500 γ B_1	4 mm	6 mm
Zur Grundkost 3.	+ 2 mg B_1	3 mm	4 mm

Nach diesen Versuchen mußten also etwa 500 γ B_1 pro 1,5 g Nahrung das B_1-Optimum darstellen. Es sei aber hier gleich darauf hingewiesen, daß dieses Ergebnis bezüglich der Optimaldosis nicht aufrechterhalten werden konnte, wie spätere Versuche zeigen werden.

Während dieser Untersuchungen kamen mir die Arbeiten VAN'T HOOGS über den Vitaminbedarf von *Drosophila* zur Kenntnis. Ich ersah daraus, daß auch VAN'T HOOG durch Autoklavieren, allerdings von Hefeextrakten, B_1 zerstörte und durch Zusatz von B_1-Präparaten den Bedarf des Vitamins bei *Drosophila* bewiesen hatte.

Mich interessierte vor allem die Methodik, die er anwandte, um den Vitamin B_2-Bedarf für *Drosophila* zu beweisen.

Van't Hoog stellte zunächst ein Dialysat des wässerigen Hefeextraktes her. Dieses Dialysat ergab mit seiner Grunddiät (siehe S. 338) einwandfreies Wachstum. Wurde dieses Dialysat aber 66 Stunden der Belichtung einer Lampe von 500 Kerzen Stärke in 1 m Entfernung ausgesetzt, so fand nur noch eine sehr kümmerliche Entwicklung statt. Dieser Mangel konnte durch Zusatz von Laktoflavin (Vitamin B_2) behoben werden. Durch die Belichtung war das Laktoflavin des Hefedialysats zum größten Teil in das inaktive Lumiflavin verwandelt worden (Bomskov, Rudy).

Ich versuchte nun, auf die gleiche Art und Weise einen Nachweis des B_2-Bedarfs bei *Tribolium* zu führen. 600 ccm eines ziemlich stark konzentrierten, wässerigen Hefeextraktes wurden in einen nahtlosen Cellophanschlauch gefüllt und der Dialyse gegen 9 l destilliertes Wasser unterworfen. Nach 17 Stunden wurde der Schlauch entfernt und die eine Hälfte des Dialysats auf dem Wasserbad zur Trockne gedampft, während die andere Hälfte auf dem Wasserbad bis auf 200 ccm eingeengt wurde. Mit dem eingedampften Teil des Dialysats wurden 2 Versuche angesetzt:

1. Mgdt. + 3% eingedampftes Dialysat,

2. Mgdt. + 2% eingedampftes Dialysat + 1% wasserunlöslichen Teil der Hefe.

Ergebnis nach 17 Tagen: Versuch 1: Kein Wachstum. — Versuch 2: Gutes Wachstum.

Ergebnis nach 30 Tagen: Versuch 1: Tiere bis 3 mm groß. — Versuch 2: Tiere verpuppt.

Diese Versuche bewiesen nochmals die Notwendigkeit des wasserunlöslichen Faktors, bewiesen aber weiterhin, daß alle anderen für *Tribolium* notwendigen Faktoren durchaus wasserlöslich und außerdem kleinmolekular sind, da sie durch die Cellophanmembran ohne weiteres hindurchdiffundieren.

Das auf 200 ccm eingeengte Dialysat wurde wie folgt behandelt. Die eine Hälfte wurde mit verdünnter Natronlauge auf ein $p_H = 8$ gebracht, da die Inaktivierung des B_2 durch Belichtung vor allem in alkalischem Medium erfolgt (Bomskov, Rudy). Die andere Hälfte dagegen wurde auf dem ursprünglichen p_H-Wert ($p_H = 6$) belassen.

Ein Teil dieser so vorbereiteten Dialysate wurde nun in flachen Schalen in etwa 30 cm Abstand 90 Min. der Bestrahlung mit einer Quecksilberdampflampe ausgesetzt, da ich vermutete, daß ich mit diesem kurzwelligen, chemisch aktiveren Licht in kürzerer Zeit als mit Glühlampenlicht die Zerstörung des Laktoflavins erreichen würde. Ein anderer Teil der Dialysate wurde einer 40stündigen Belichtung mit einer Glühbirne von 150 Watt im Abstand von 20 cm ausgesetzt. Als ich aber die

bestrahlten Lösungen verfütterte, zeigten sich keinerlei Mangelerscheinungen. Ich wiederholte nun die Bestrahlungen mit sauren und alkalischen Dialysaten und verdoppelte die Belichtungsdauer. Aber auch diesmal blieb der Erfolg aus. Nicht die geringste Wachstumshemmung war wahrzunehmen. Es bestand ja nun noch die Möglichkeit, daß *Tribolium* gegen B_2-Mangel nicht empfindlich ist. Doch dagegen sprach die Überlegung, daß Laktoflavin als Bestandteil des gelben Atmungsfermentes für die lebende Zelle unentbehrlich ist (Lenartz) und deshalb mit der Nahrung zugeführt werden muß, falls der betreffende Tierkörper nicht zur Eigensynthese befähigt ist, was aber bei dem Vitamin B_2 bisher noch nicht beobachtet wurde.

Es war also nötig, andere Wege einzuschlagen, um den B_2-Bedarf bei *Tribolium* nachzuweisen. Nach Bomskov und den anderen Autoren ist sowohl B_1 als auch B_2 alkaliempfindlich. Diese Hinweise halfen mir weiter. Es wurde also nun versucht, mit Alkali und Hitze die Vitamine B_1 und B_2 zu zerstören.

Zunächst waren wieder einige orientierende Vorversuche notwendig. Zwei Extreme wurden für die Alkalibehandlung der Hefe gewählt.

Erste Alkalibehandlung der Hefe.

10 g Hefe wurden in 1 l Wasser suspendiert. Danach wurde die Lösung mit verdünnter Natronlauge auf $p_H = 8$ gebracht, erhitzt und 45 Min. in schwachem Kochen gehalten. Darauf wurde mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert und filtriert. Der Filterrückstand (Bezeichnung: NaOH-F.R.) wurde gut mit Wasser ausgewaschen und getrocknet und das Filtrat (Bezeichnung: NaOH-Filtrat) auf dem Wasserbad eingedampft.

Mit diesen Produkten wurden die nachstehenden Versuche durchgeführt.

Grunddiät: Mgdt. + 2% NaOH-F.R. + 2% NaOH-Filtrat.

Tabelle 2.

		Wachstumsergebnis nach	
		18 Tagen	25 Tagen
Zur Grunddiät 1.	+ 500 γ B_1	2 mm	3 mm, meist tot
Zur Grunddiät 2.	+ 10 γ B_2	etwa 3 mm	bis 4,5 mm, z. T. tot
Zur Grunddiät 3.	+ 500 γ B_1 + 10 γ B_2	etwa 5 mm	meist verpuppt, z. T. tot

Zweite Alkalibehandlung der Hefe.

100 g Hefe wurden in 1 Liter 1%iger Natronlauge 2,5 Stunden im Wasserbad gekocht, mit Schwefelsäure neutralisiert, filtriert, das Filtrat auf dem Wasserbad eingedampft und der Filterrückstand mit Wasser ausgewaschen und getrocknet.

Es wurden mit diesen Produkten die entsprechenden Versuche wie oben angesetzt.

Von den Ergebnissen dieser zweiten Versuchsreihe will ich nur anführen, daß nur bei der Zugabe von 500 γ B_1 + 10 γ B_2 ein sehr, sehr kümmerliches Wachstum stattfand. Die Tiere, die nur B_1 oder nur B_2 bekamen, wuchsen überhaupt nicht.

Beim Vergleich der ersten und zweiten Alkalibehandlung der Hefe ist ersichtlich, daß in der zweiten Versuchsreihe durch die starke Natronlauge und durch das lange Kochen anscheinend noch ein anderer für *Tribolium* wichtiger Faktor außer den Vitaminen B_1 und B_2 zum größten Teil zerstört worden ist, während in der ersten Versuchsreihe die quantitativen Verhältnisse ganz gut getroffen zu sein schienen. Augenscheinlich sind hier die Faktoren noch nicht genug zerstört, um quantitative Versuche über B_1- und B_2-Bedarf zu rechtfertigen, da ja auch bei Zugabe von nur einem der Vitamine B_1 oder B_2 noch ein schwaches Wachstum stattfand. Qualitativ dürften die Ergebnisse dieser Versuche aber schon eindeutig den Vitamin B_2-Bedarf bei *Tribolium* demonstrieren. Gleichzeitig wird auch der Vitamin B_1-Bedarf noch einmal vor Augen geführt.

Um die quantitativen Verhältnisse des Laktoflavinbedarfs aufzuklären, und auch das B_1-Optimum nochmals zu prüfen, war es nötig, den Grad an Alkalität und die Hefemenge und Kochzeit herauszufinden, die am besten die Vitamine B_1 und B_2 zerstören, ohne allen anderen Komponenten zu schaden.

Es muß hier eingefügt werden, daß von hier an bis zur endgültigen B_2-Bestimmung immer 8 γ B_2 gegeben wurden, da bei Zugabe von 10 γ B_2 stets eine sehr hohe Sterblichkeit zu beobachten war.

Nun wurden 3 Versuche durchgeführt, um möglichst gute quantitative B_1- und B_2-Zerstörung herauszufinden.

I.

5 g Hefe wurden in 1 l Wasser, das mit verdünnter Natronlauge auf $p_H = 9{,}5$ gebracht worden war, 50 Min. gekocht, neutralisiert, filtriert, das Filtrat eingedampft und der Filterrückstand gewaschen und getrocknet.

1. Fütterungsversuch:

Grunddiät: Mgdt. + 2% NaOH-F.R. v. 5 g Hefe + 2% NaOH-Filtrat v. 5 g Hefe

Tabelle 3.

		Wachstumsergebnis nach	
		17 Tagen	24 Tagen
1. Grunddiät . . .	ohne B_1 u. ohne B_2	2 mm	bis 3 mm z. T. tot
2. Grunddiät . . .	+ 500 γ B_1 + 8 γ B_2	5,5 mm	z. T. verpuppt z. T. tot

II.

8 g Hefe wurden behandelt wie bei I.

2. Fütterungsversuch:

Grunddiät: Mgdt. + 2% NaOH-F.R. v. 8 g Hefe + 2% NaOH-Filtrat v. 8 g Hefe

Tabelle 4.

		Wachstumsergebnis nach	
		17 Tagen	24 Tagen
1. Grunddiät . . .	ohne B_1 u. ohne B_2	2 mm	3,5 mm, z. T. tot
2. Grunddiät . . .	+ 500 γ B_1 + 8 γ B_2	5 mm	z. T. verpuppt z. T. tot

III.

15 g Hefe wurden behandelt wie bei I.

3. Fütterungsversuch:

Grunddiät: Mgdt. + 2% NaOH-F.R. v. 15 g Hefe + 2% NaOH-Filtrat v. 15 g Hefe

Tabelle 5.

		Wachstumsergebnis nach	
		17 Tagen	24 Tagen
1. Grunddiät	ohne B_1 u. ohne B_2	3 mm	3—5,5 mm, wenig Tote
2. Grunddiät	+ 500 γ B_1 + 8 γ B_2	5,5 bis 7 mm	verpuppt, wenig Tote

Aus den 3 Tabellen 3—5 ist zu ersehen, daß die Verhältnisse für quantitative Untersuchungen im ersten Versuch am günstigsten sind, denn dort findet ohne Zusatz von B_1 und B_2 fast überhaupt kein Wachstum statt, während in den Versuchen 2 und 3 auch ohne B_1- und B_2-Zusatz ein mehr oder weniger deutliches Wachstum möglich ist.

Für die quantitativen Untersuchungen wurden deshalb die Produkte des Versuches 1, die durch Alkalibehandlung von 5 g Hefe gewonnen wurden, genommen.

Nach dieser Vorarbeit konnte ich mich der quantitativen B_2-Untersuchung zuwenden, da ich ja das B_1-Optimum schon mit 500 γ pro 1,5 g Diät festgestellt zu haben glaubte.

Folgende Versuchsserie wurde nun angesetzt: Grunddiät:

Mgdt. + 2% NaOH-F.R. v. 5 g Hefe + 2% NaOH-Filtrat v. 5 g Hefe + 500 γ B_1

Zu dieser Grunddiät wurden verschiedene Mengen von Vitamin B_2 zugesetzt. Die Ergebnisse sind aus der unten wiedergegebenen Tabelle 6 zu ersehen. Weiterhin gibt die graphische Darstellung (Abb. 2) die Verhältnisse bezüglich der Größe und der Zahl der am 18. Tage noch lebenden Tiere wieder.

Tabelle 6.

		Wachstumsergebnis nach	
		18 Tagen	25 Tagen
Zur Grunddiät 1.	$+ {}^1/_5\,\gamma\ B_2$	2 mm	2 mm, meist tot
Zur Grunddiät 2.	$+ 1\,\gamma\ B_2$	bis 3 mm	etwa 4 mm
Zur Grunddiät 3.	$+ 2\,\gamma\ B_2$	3—3,8 mm	5—6 mm
Zur Grunddiät 4.	$+ 4\,\gamma\ B_2$	3,5—5 mm	7 mm und erste Puppen
Zur Grunddiät 5.	$+ 6\,\gamma\ B_2$	4—5 mm	7 mm und erste Puppen
Zur Grunddiät 6.	$+ 8\,\gamma\ B_2$	4—4,8 mm	bis 7 mm und erste Puppen, Tiere z. T. tot
Zur Grunddiät 7.	$+ 10\,\gamma\ B_2$	drei lebende Tiere 5 mm groß	1 Puppe
Zur Grunddiät 8.	$+ 12\,\gamma\ B_2$	zwei lebende Tiere 4 und 5 mm groß	zwei 6—7 mm große Tiere
Zur Grunddiät 9.	$+ 20\,\gamma\ B_2$	alle Tiere tot	

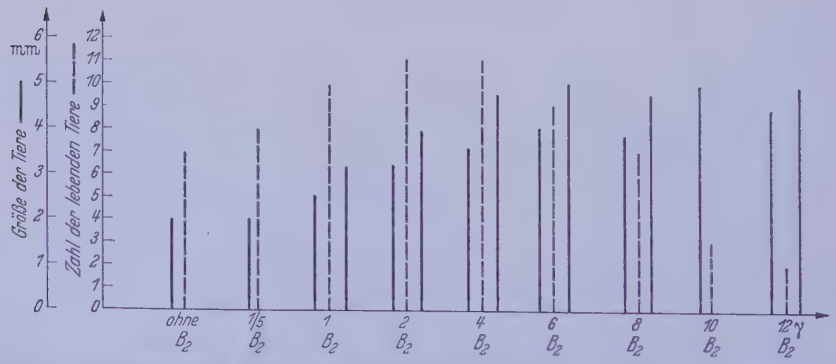


Abb. 2. Die senkrechten ausgezogenen Linien geben die Größe der Tiere und die gestrichelten Linien die Zahl der am 18. Tage noch lebenden Tiere an. Wo 2 ausgezogene Linien für einen B_2-Wert gezeichnet wurden, geben sie die Größe des kleinsten und größten Tieres in dieser Kost an.

Aus der Tabelle 6 und der Abb. 2 ist zu entnehmen, daß das optimale Wachstum etwa bei Zugabe von $4\,\gamma$ bis $6\,\gamma$ B_2 pro 1,5 g Diät erreicht ist. Bei höheren Gaben tritt zwar kaum Wachstumsverzögerung ein, dafür nimmt aber die Sterblichkeit mit immer höheren B_2-Gaben ständig zu. Schon bei $8\,\gamma$ B_2 war fast die Hälfte aller Tiere tot, bei $10\,\gamma$ und $12\,\gamma$ B_2 lebten nach 18 Tagen von den 12 eingesetzten Tieren meist nur noch 3 oder 2, die sich in der Größe kaum von den Tieren, die $4\,\gamma$ oder $6\,\gamma$ B_2 erhielten, unterschieden. Erst bei der

Verpuppung trat bei diesen 10 γ- und 12 γ-Tieren eine Verzögerung ein. Höhere Gaben von B_2 als 12 γ pro 1,5 g Diät wirkten schon nach wenigen Tagen tödlich.

Das Optimum der B_2-Wirkung liegt nun, wie schon festgestellt, bei 4 γ—6 γ B_2. Sollte da nicht das früher gefundene B_1-Optimum von 500 γ B_1 zu hoch gegriffen sein? Es lag näher, das B_1-Optimum in der Größenordnung des B_2-Optimums anzunehmen.

Schon folgende kleine Serie von orientierenden Versuchen bewies, daß diese Gedankengänge richtig waren (s. Tab. 7). Grunddiät:

$$\text{Mgdt.} + 2\,\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\,\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 6\,\gamma\ B_2$$

Die Ergebnisse zeigen, daß mit 10 γ B_1 dasselbe gute Wachstum wie mit 100 γ B_1 erreicht wurde, während mit 1 mg B_1 eine Entwicklungsverzögerung eintrat.

Tabelle 7.

		Wachstumsergebnis nach 18 Tagen
1. Grunddiät	ohne B_1	bis 3 mm
2. Grunddiät	+ 10 γ B_1	5—6 mm
3. Grunddiät	+ 100 γ B_1	5—6 mm
4. Grunddiät	+ 1 mg B_1	3—5 mm

Daraufhin wurde noch einmal eine Prüfung mit einer Serie von B_1-Werten durchgeführt. Grunddiät:

$$\text{Mgdt.} + 2\,\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\,\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 6\,\gamma\ B_2$$

Tabelle 8.

		Wachstumsergebnis am 17. Tag	Verpuppungstermin
1. Grunddiät	ohne B_1	bis 3 mm	Auch nach 40 Tagen keine Puppe, Larven verschieden groß
2. Grunddiät	+ 2 γ B_1	3,5—5 mm	26.—30. Tag
3. Grunddiät	+ 6 γ B_1	5—6 mm	23.—27. Tag
4. Grunddiät	+ 10 γ B_1	5—6 mm	23.—27. Tag
5. Grunddiät	+ 100 γ B_1	5—6 mm	23.—28. Tag
6. Grunddiät	+ 500 γ B_1	3—5 mm	27.—32. Tag

Die Abb. 3 entspricht den Werten der Tabelle 8 am 17. Tag. Aus jeder Tube wurde ein Durchschnittstier bzw., wenn große Unterschiede herrschten, die beiden Extremwerte photographiert.

Die Ergebnisse lehren, daß eine Dosis von 6 γ B_1 pro Tube schon die optimale Entwicklungsgeschwindigkeit gewährleistet, daß aber auch eine Gabe von 100 γ pro Tube nicht schadet, sondern höchstens eine kleine Verzögerung in der Verpuppungszeit zur Folge hat. Selbst ein Überschuß von 500 γ B_1 wirkt nur schwach toxisch.

Es muß weiterhin noch darauf hingewiesen werden, daß auch ohne B_1-Zugabe ein langsames Wachstum möglich ist, sicher ein Zeichen dafür, daß nicht alles B_1 durch die Alkalibehandlung der Hefe restlos zerstört wurde, was aber, wenn es unbedingt darauf ankäme, sicher durch höheres p_H der Lösung oder durch längeres Kochen erreicht werden könnte.

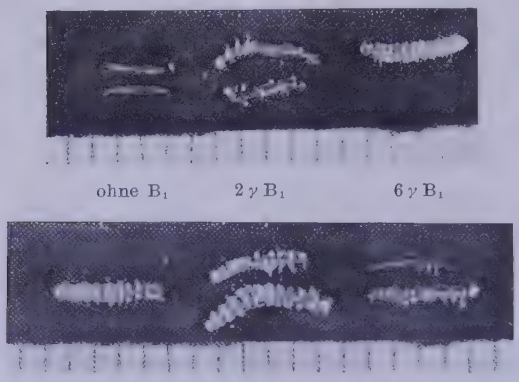


Abb. 3. Die zu den Tieren gehörenden B_1-Werte beziehen sich jeweils auf die B_1-Mengen, die zur Grunddiät:

Mgdt. + 2% NaOH-F.R.-Hefe v. 5 g + 2% NaOH-Filtrat v. 5 g Hefe + 6 γ B_2

zugesetzt wurden.

Nach Feststellung dieses B_1-Optimums war unbedingt noch einmal zu prüfen, ob nun bei der niedrigen B_1-Dosierung auch das B_2-Optimum bei 4 γ—6 γ B_2 erhalten bleiben würde, da ich ja das B_2-Optimum mit Gaben von 500 γ B_1 pro Tube geprüft hatte.

Die folgende Versuchsreihe schaffte darüber Aufklärung. Grunddiät:

$$\text{Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1$$

Tabelle 9.

		Wachstumsergebnis am 17. Tag	Verpuppungstermin
1. Grunddiät	ohne B_2	bis 2 mm	Am 30. Tag etwa 3 mm groß, meist aber tot
2. Grunddiät	+ 2 γ B_2	3 –5 mm	26. –32. Tag
3. Grunddiät	+ 4 γ B_2	4,5 –6 mm	24.—28. Tag
4. Grunddiät	+ 6 γ B_2	5 –6 mm	23. –28. Tag 4 Tote
5. Grunddiät	+ 8 γ B_2	5 –6 mm	23. –28. Tag Hälfte tot
6. Grunddiät	+ 10 γ B_2	5—6 mm nur 4 Tiere leben	25.—28. Tag

Aus dieser Serie ist nun zu ersehen, daß auch bei kleinen B_1-Gaben das Optimum für Vitamin B_2 etwa 6 γ pro 1,5 g Diät beträgt.

In den in diesen Versuchen verwandten Hefeprodukten war nie eine Zerstörung anderer benötigter Faktoren, die außer den Vitaminen B_1 und B_2 in der Nahrung enthalten sein müssen, zu bemerken. Das B_1-Optimum, das anfangs mit autoklavierter Hefe festgestellt worden war, dürfte sich aber sicher wegen der teilweisen Zerstörung anderer wichtiger Faktoren durch das 7stündige Autoklavieren als falsch erwiesen haben.

Dadurch ist wahrscheinlich die Koordination der akzessorischen Nährstoffe des Futters gestört worden.

Aus den Ergebnissen dieser Versuchsreihen läßt sich also zusammenfassend folgendes feststellen:

Tribolium braucht außer dem wasserunlöslichen Faktor der Hefe noch die beiden wasserlöslichen Vitamine B_1 und B_2 für Wachstum und Entwicklung, und zwar entfalten diese beiden Wirkstoffe schon in sehr geringen Dosen, wie bei diesen kleinen Tieren nicht anders zu erwarten war, ihre optimale Wirksamkeit.

Es erhebt sich nun die Frage, ob außer B_1 und B_2 noch weitere wasserlösliche Faktoren eine Rolle spielen.

Darüber gibt folgender Versuch Aufschluß:

Mgdt. + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe + 8 γ B_1[1] + 6 γ B_2. 8 γ B_1 und 6 γ B_2 liegen im Bereich des in den vorhergehenden Versuchen festgestellten Optimums.

In dieser Kost wachsen die Tiere nicht oder nur ganz wenig und sterben nach und nach. Auch wenn die B_1- und B_2-Mengen variiert werden, läßt sich weder Wachstum noch Entwicklung beobachten. Es steht somit fest, daß außer B_1 und B_2 noch mindestens ein weiterer Faktor, der wasserlöslich ist, da er ja im Hefedialysat vorkommt, für die Ernährung von *Tribolium* wichtig ist. Er ist kleinmolekular, also allem Anschein nach kein Eiweißkörper, und er ist alkalistabiler als B_1 und B_2, da er ja in der mit Alkali behandelten Hefe, in der Vitamin B_1 und B_2 zerstört sind, noch vorkommt. Ich nenne ihn, da er in Hefe vorkommt und wasserlöslich ist, vermutlich also der Gruppe der B-Vitamine einzuordnen ist, **Vitamin B_x**.

Es steht also nun fest, daß für Wachstum und Entwicklung von *Tribolium* mindestens 4 in der Hefe vorkommende Faktoren nötig sind.

Mit diesem unbekannten Hefefaktor B_x müssen wir uns im folgenden Abschnitt noch genauer befassen. Es kann sich hier um einen oder mehrere völlig unbekannte Faktoren der Hefe handeln, oder es liegen hier einer oder mehrere wasserlösliche Faktoren der Hefe vor, die man mit den Namen Vitamin B_5, Vitamin B_6, pellagra preventive factor (P.P.-Faktor), Antiblacktonguefaktor und Filtratfaktor belegt hat.

Vitamin B_5 ist ein von manchen Vögeln benötigtes Vitamin (Bomskov, O'Brien, Ammon-Dirschel). Mit Vitamin B_6 wird der die Rattenpellagra verhindernde Faktor bezeichnet, der sich vom P.P.-Faktor,

[1] Ich nahm in diesem Versuch und auch in den meisten späteren Versuchen die Menge von 8 γ B_1, obgleich nach den Versuchsergebnissen zu urteilen, eine B_1-Zugabe von 6 γ schon genügt, um normale Entwicklung zu gewährleisten. Diese geringe Überzufuhr schadete bestimmt nicht, und ich hatte dafür die Gewähr, daß nie Mangelerscheinungen — etwa wegen schlechter Verteilung des B_1 in der Nahrung — auftraten.

der den Menschen vor Pellagra schützt, unterscheiden soll. Der Antiblacktonguefaktor muß in der Nahrung der Hunde enthalten sein. Für das Gedeihen der Ratten ist unter anderem der sog. Filtratfaktor nötig, der dadurch chemisch charakterisiert ist, daß er nicht von Fullererde adsorbiert wird.

Von den wasserlöslichen Vitaminen der Hefe sind aber nur das B_1, das B_2 und der Antiblacktonguefaktor genau bekannt und auch in der chemischen Konstitution aufgeklärt, während die anderen eben angeführten Faktoren vor allem in ihrem chemischen Verhalten erst notdürftig charakterisiert sind. Ihr Nachweis erfolgte mitunter an verschiedenen tierischen Objekten, und die Angaben der verschiedenen Autoren widersprechen sich zum Teil. Neuerdings ist auch die chemische Natur des Vitamins B_6, das die Rattenpellagra verhindert, von KUHN aufgeklärt worden.

Von besonderer Wichtigkeit für meine weitere Arbeit war daher die Feststellung der chemischen Eigenschaften des Faktors B_x bzw. der im B_x eventuell vorliegenden Komponenten. Aus dem Vergleich dieser Eigenschaften mit den bereits bekannten schon oben genannten in Frage kommenden Faktoren der Hefe, ließen sich sodann eventuell Schlüsse ziehen, mit welchen Vitaminen oder vitaminähnlichen Stoffen ich es hier zu tun hatte.

Außer in Hefe wurde das B_x auch in Kalbsleber gefunden. Feingehackte Kalbsleber wurde mit schwach essigsaurem Wasser extrahiert, der Extrakt filtriert, das Filtrat mit Natronlauge neutralisiert und eingedampft (= Leberextrakt).

Zwei Versuche wurden nun mit dem Leberextrakt ausgeführt.

1. Mgdt. + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe + 8 γ B_1 + 6 γ B_2 + 2% Leberextrakt,

2. Mgdt. + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe + 8 γ B_1 *ohne* B_2 + 2% Leberextrakt.

	Wachstumsergebnis nach	
	17 Tagen	25 Tagen
Versuch 1	3,5—4 mm	etwa 6 mm
Versuch 2	4—6 mm	z. T. verpuppt

Da im Versuch 2 das B_2 weggelassen wurde, ist dort besseres Wachstum zu verzeichnen. Das ist damit zu begründen, daß der Leberextrakt auch schon B_2-reich ist. Infolgedessen tritt die toxische Wirkung der B_2-Überzufuhr deutlich zutage, die sich nicht, wie bei reiner B_2-Zufuhr bei den Optimumversuchen in höherer Sterblichkeit, sondern durch Wachstumshemmung äußert.

Es wurde hier also erstmalig eine B_2-Hypervitaminose beobachtet. Bisher waren derartige Hypervitaminosen, hervorgerufen durch überreichliche Zufuhr in der Nahrung, nur bei den Vitaminen A und D

bekannt (Ammon und Dirschel). An dieser Stelle muß ich gleichzeitig auch noch einmal an die Wachstumshemmungen, die durch hohe Vitamin B_1-Gaben (500 γ und mehr) hervorgerufen werden, erinnern. Auch hier liegt toxische Wirkung durch Überzufuhr in der Nahrung vor. Ammon und Dirschel berichten, daß bei Säugetieren eine B_1-Hypervitaminose nur durch subkutane oder intravenöse Zufuhr erreicht werden kann, während eine Überzufuhr von B_1 in der Nahrung zur Erzeugung einer Hypervitaminose zwecklos ist, da die Tiere den Überschuß anscheinend sofort wieder ausscheiden.

Im Verlauf weiterer Nachforschungen über das Vorkommen von B_x wurde ich auf folgenden Tatbestand aufmerksam. Bomskov (Methodik der Vitaminforschung, S. 244) erwähnt den Faktor Y von Chick und Copping, der z. B. in Hefe vorkommt und heute mit Vitamin B_6 identifiziert wird. Dieser Faktor kommt nicht im Eiklar des Hühnereies vor. Wie ich durch den Versuch erweisen konnte, kommt auch das B_x im Hühnereiklar nicht vor. Versuch:

$$\text{Mgdt.} + 2\,\% \begin{matrix}\text{wasserunlöslicher}\\ \text{Teil der Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1 + 6\,\gamma\ B_2 + 3\,\%\ \text{Eiklar.}$$

Es erfolgt kein Wachstum.

Nun füttern aber Chick und Copping das Eiklar gleichzeitig als Vitamin B_2-Quelle. Auch in der neuen Vitaminliteratur wird der Gehalt des Eiklars an B_2 angeführt (Stepp-Kühnau-Schröder). In mehreren Versuchen, die ich anschließend aufführe, konnte ich mit meinem auf B_2 so empfindlich reagierenden Testobjekt, *Tribolium*, im rohen oder auch im geronnenen Eiereiweiß kein B_2 nachweisen.

Zwei Versuche zur B_2-Prüfung des Eiklars sollen hier angegeben werden:

1. $\text{Mgdt.} + 2\,\%\ \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\,\%\ \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1 + 3\,\%\ \begin{matrix}\text{gekocht}\\ \text{Eiklar}\end{matrix}$

2. $\text{Mgdt.} + 2\,\%\ \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\,\%\ \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1 + 3\,\%\ \begin{matrix}\text{rohes}\\ \text{Eiklar.}\end{matrix}$

In beiden Versuchen erfolgte kein Wachstum. Worauf diese negativen Ergebnisse zurückzuführen sind, konnte ich bisher nicht entscheiden.

Unter der Annahme, daß es sich bei dem Faktor B_x um das Vitamin B_6 handeln könnte, da B_6 auch alkalistabil sein soll (Bomskov u. a.), legte ich die von György betroffene Feststellung, daß das Vitamin B_6 gegen sichtbares Licht empfindlich ist, für einen weiteren Versuch zugrunde.

30 mg NaOH-Filtrat von 5 g Hefe (= 2 % der Kost) wurden in 100 ccm Wasser suspendiert, die Lösung in eine weiße, das Licht gut reflektierende Porzellanschale gefüllt und unter Wasserkühlung aus einer

Entfernung von 4 cm 20 Stunden mit einer 200kerzigen Glühbirne bestrahlt. Nach der Belichtung wurde die Lösung auf dem Wasserbad eingedampft und zur Diät zugegeben. Versuche:

$$\text{1. Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{belichtetes}\\ \text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1 + 6\,\gamma\ B_2$$

Zum Vergleich:

$$\text{2. Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{unbelichtetes}\\ \text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1 + 6\,\gamma\ B_2$$

In beiden Diäten erfolgte gleich gutes Wachstum, und es waren nicht die geringsten Unterschiede an den Tieren der beiden Kostformen wahrzunehmen. Das NaOH-Filtrat ist aber die einzige Fraktion dieser Diäten, die das B_x enthält und also auch das Vitamin B_6 enthalten könnte. Demnach wäre also B_x nicht identisch mit B_6; auch als Teilfaktor des eventuellen B_x-Komplexes müßte B_6 ausschalten. Restlos geklärt aber ist diese Frage damit noch nicht, da neuerdings von von Euler die Photosensibilität von B_6 bestritten wird.

Als weitere Eigenschaft des Vitamins B_6 führt von Euler die hohe Alkali- und Hitzestabilität dieses Körpers an. Durch 4stündiges Autoklavieren bei $p_H = 10$ und 120^0 wird es nicht zerstört. Auch Bomskov führt an, daß Vitamin B_6 wie auch B_5 gegen Autoklavieren in alkalischer Lösung beständig sind. Auf dieser Angabe fußt folgende Versuchsanordnung: In 150 ccm Wasser wurde 1 g wässeriger Hefeextrakt gelöst und mit verdünnter Natronlauge auf $p_H = 10$ gebracht. Nach 4stündigem Autoklavieren bei 120^0 und 1,3 Atm. Überdruck wurden die ausgefallenen Stoffe abfiltriert, die Lösung mit verdünnter Salzsäure neutralisiert und eingedampft. Mit dem Eindampfungsprodukt wurde dann folgender Versuch angesetzt:

$$\text{Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{wasserunlöslicher}\\ \text{Teil der Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1 + 6\,\gamma\ B_2 + 2\% \begin{matrix}\text{des Eindampfungs-}\\ \text{produktes.}\end{matrix}$$

Nach schwachem Wachstum starben die Tiere schließlich nach und nach. Der Faktor B_x kann also mit dem Vitamin B_6 nicht identisch sein. Neueste Untersuchungen, die ich kürzlich mit reinem Vitamin B_6 durchführte, zeigten, daß der Faktor B_x nicht mit B_6 identisch ist, denn wenn statt des B_x das Vitamin B_6 in verschiedenster Dosierung verfüttert wurde, fand kein Wachstum statt. Es ist aber nun nicht ausgeschlossen, daß B_6 als Komponente im B_x vorhanden ist. Untersuchungen in dieser Richtung sind noch nicht abgeschlossen.

Von Euler spricht die Vermutung aus, daß B_6 eventuell mit Nicotinsäureamid identisch ist, das einen Bestandteil des wasserstoffübertragenden Fermentes der Atmung (Co-Dehydrase II) darstellt. Elvehjem hat die Identität des von Hunden benötigten Antiblacktonguefaktors mit Nicotinsäureamid bewiesen. Macrae und Edgar hatten aber mit

Nicotinsäureamid keinen Erfolg, als sie im Futter von Ratten den Fullererdefiltratfaktor oder den Fullererdeadsorbatfaktor durch dieses Produkt ersetzen wollten.

Es war also noch zu prüfen, ob sich mit Nicotinsäureamid, an Stelle von B_x verfüttert, im Triboliumversuch Erfolge erzielen lassen. Ich reichte Mengen von 2 γ bis 1 mg Nicotinsäureamid, konnte aber kein Wachstumsergebnis erzielen. Die Tiere starben bei den höheren Gaben sehr bald.

Schließlich wurde noch untersucht, ob B_x etwa mit dem von KOLLATH gefundenen Hefe-Getreide-Faktor (H.G.-Faktor) identisch ist, der erst durch 2stündige Trockensterilisation bei 180° zerstört wird. Anstatt des B_x wurden 2% Hefe, die 2 Stunden lang auf 165—166° erhitzt worden war, gefüttert, aber es blieb jeglicher Wachstumserfolg aus. Hier sei auch angefügt, daß das B_x nicht im mit Äthyläther extrahierten Eigelb vorkommt.

Nach Prüfung all dieser Angaben an *Tribolium* ging ich notwendigerweise daran, noch weitere chemische Eigenschaften des Faktors B_x aufzufinden. Für die Fütterungsversuche blieb auch weiterhin die bisher benutzte Grunddiät bestehen, d. h. zu

Mgdt. + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe + 8 γ B_1 + 6 γ B_2

wurde immer das jeweils auf B_x zu prüfende Produkt gegeben.

Ausgangsmaterial für B_x-Konzentrate war zunächst der durch Extraktion der Hefe mit Wasser erhaltene Hefeextrakt. Dieser Hefeextrakt wurde zur Ausfällung der Eiweißkörper und der an die Fällung adsorbierten Stoffe mit einer Lösung von 25%igem Bleiacetat versetzt, bis keine weitere Fällung mehr entstand. Der Niederschlag wurde nach dem Absetzen abfiltriert und das Filtrat mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, um die Hauptmenge des überschüssigen Bleis als Bleisulfat auszufällen. Das Filtrat dieser Fällung wurde dann eingedampft (= Bleifiltrat).

Der mit Bleiacetat erzeugte Niederschlag wurde nach mehrmaligem Auswaschen durch Rühren in heißem Wasser suspendiert. Zu dieser Suspension gab ich verdünnte Schwefelsäure bis zum $p_H = 3$ und ließ den nun entstehenden Niederschlag von Bleisulfat absetzen, filtrierte ihn ab, neutralisierte das Filtrat mit verdünnter Natronlauge und dampfte es ein (= zerlegter Bleiniederschlag). Bei der Zerlegung des mit Bleiacetat entstandenen Niederschlages richtete ich mich hauptsächlich nach den Angaben BOMSKOVS, der diese Methode zur Gewinnung von Vitamin B_2-Konzentraten angibt.

Mit den beiden gewonnenen Produkten, Bleifiltrat und zerlegter Bleiniederschlag, ließen sich wieder eine ganze Reihe von Versuchen ansetzen. Dabei wurde das B_x in der Kost durch die verschiedensten Mengen dieser beiden Produkte, einzeln oder miteinander kombiniert,

ersetzt. Zusammenfassend läßt sich über die Ergebnisse folgendes sagen: Das beste Wachstum und die geringste Sterblichkeit war bei den Diäten festzustellen, welche die beiden Produkte kombiniert enthielten. Es sei jedoch bemerkt, daß ein ideales Wachstum — etwa 24 Tage bis zur Verpuppung — nie stattfand, sondern daß die ersten Puppen frühestens nach 35 Tagen, meist erst nach 40 Tagen, erschienen.

Die Resultate, die mit Zusatz von zerlegtem Bleiniederschlag allein erreicht wurden, waren etwa die gleichen wie die, die durch beide Produkte erzielt wurden. Nur selten traten hier schlechtere Wachstumswerte auf. Sehr hohe Sterblichkeit und auch langsamere Entwicklung war bei den Tieren zu beobachten, die statt des B_x das Bleifiltrat erhielten.

Der hemmende Einfluß, der sich hier in der Verzögerung der Entwicklungsgeschwindigkeit und in Wachstumshemmung äußert, konnte vielleicht wieder auf eine Überdosierung von Vitamin B_2 zurückzuführen sein. Durch die Fällung mit Bleiacetat wird ja auch die Hauptmenge des B_2 ausgefällt (Bomskov 1935) und geht somit in die Konzentrate. Demzufolge schlug ich einen etwas anderen Weg ein.

Wie in früheren Versuchen ausgeführt wurde, ließen sich das B_2 wie auch das B_1 durch Alkalibehandlung zerstören. Diese Tatsache benutzte ich nun, um eine B_1- und B_2-freie B_x-Lösung herzustellen. Das NaOH-Filtrat, das bei der quantitativen B_1- und B_2-Untersuchung benutzt wurde, mußte ja die B_x-Fraktion enthalten, und ich verwandte dieses Produkt folgendermaßen: Das eingedampfte NaOH-Filtrat wurde in heißem Wasser gelöst und die unlöslichen Bestandteile abfiltriert. B_x ging als wasserlösliche Substanz, wie auch der Fütterungsversuch zeigte, in Lösung. Diese sog. B_x-Lösung, die, wie schon erwähnt, B_1 und B_2 höchstens in Spuren enthalten konnte, wurde nun ebenfalls einer Fällung mit Bleiacetat unterworfen. Mit den dabei erhaltenen Produkten — Bleifiltrat und zerlegter Bleiniederschlag — waren aber die Fütterungsergebnisse auch wenig befriedigend. Wachstum und Entwicklung waren im Vergleich zu den Bleifällungsprodukten des Hefeextraktes eher als noch schlechter zu bezeichnen.

Zusammenfassend muß also über diese Versuche mit Bleiacetatfällung gesagt werden, daß die B_x-Wirksamkeit hauptsächlich in den Bleiniederschlag geht. Es ist dabei kein eindeutiger Hinweis darauf gegeben, daß B_x sich aus mehreren Komponenten zusammensetzen könnte. Zu beachten ist dabei noch, daß auch die wirksamsten Konzentrate eine sehr abgeschwächte Wachstums- und Entwicklungswirkung haben.

Kurz erwähnen will ich an dieser Stelle, daß auch B_x-Fällungen mit Phosphorwolframsäure versucht wurden. Dabei waren überhaupt nur kümmerliche Wachstumsergebnisse zu erhalten. Mit den Produkten dieser Fällungen wurde nie eine Entwicklung bis zur Puppe beobachtet.

Bessere Ergebnisse waren mit der Kohleadsorption des Hefeextraktes zu erzielen. Der wässerige Hefeextrakt wurde vor der Adsorption 2 Stunden autoklaviert, bei 120° und 1,3 Atm. Überdruck, um die kolloidalen Bestandteile zur Koagulation zu bringen. Der Niederschlag wurde abfiltriert und die nun fast klare Lösung mit Aktivkohle (Carbo medicinalis, Merck), 5 g/100-ccm-Lösung, versetzt und 30 Min. gerührt. Die Kohle wurde dann abfiltriert und samt Filter in mit Salzsäure bis $p_H = 4$ angesäuerten 50%igen Alkohol 12 Stunden kalt und 40 Min. auf dem Wasserbad bei 80° eluiert. Das Eluat wurde danach von der Kohle befreit, der Alkohol abdestilliert, die Lösung neutralisiert und eingedampft. Das Eindampfungsprodukt als B_x in verschiedenen Mengen verfüttert, rief auch eine vollkommene Entwicklung der Tiere hervor, nur wurde auch hier die optimale Entwicklungsdauer vom Einsetzen der Larven bis zur Verpuppung mit 37 Tagen gefunden, und man kann auch hier durchaus von keinem guten Wachstum sprechen.

Wenn man die Herstellungsweise dieses letzteren B_x-Konzentrates durch Adsorption mit Kohle beachtet, so wird man dabei auf das Vitamin B_5 hingewiesen. Bomskov berichtet nämlich, daß ein Konzentrierungsverfahren des B_5 durch Adsorption an Kohle und Eluieren mit angesäuertem 50%igem Alkohol möglich ist.

Zur weiteren Charakterisierung des B_x sollte noch ein zweites Adsorptionsmittel, Fullererde, angewandt werden. Im folgenden sind nun diese Versuche zu beschreiben. Beim Nachweis der B_1- und B_2-Wirksamkeit für *Tribolium* hatte ich — in noch nicht erwähnten Versuchen — schon einmal durch Adsorption an viel Fullererde bei $p_H = 6$ die Vitamine B_1 und B_2 aus dem Hefeextrakt zum größten Teil entfernt. Für qualitative Versuche genügten die Ergebnisse, die damit erzielt wurden, durchaus, denn erst durch Zusatz von Vitamin B_1 und B_2 zu dem mit Fullererde adsorbierten Hefeextrakt wurde er wieder vollwertig, und es konnte gutes Wachstum erzielt werden. Für die quantitative Feststellung der Vitaminwirksamkeit waren aber die mit Alkali behandelten Hefeprodukte entschieden besser geeignet.

Bei der Fulleradsorption des wäßrigen Hefeextraktes bei $p_H = 6$ war kaum eine Adsorption des B_x nachzuweisen. Für Versuche, durch Fullererde B_x zu adsorbieren, mußte also eventuell ein anderes p_H gewählt werden.

Ich benutzte nun zunächst für weitere Versuche den wäßrigen Hefeextrakt. Durch Zusatz von Salzsäure stellte ich ein $p_H = 1$ her und versetzte die Lösung mit reichlichen Mengen von Fullererde (5 g/100-ccm-Lösung). Nach 30 Min. dauerndem Rühren wurde die Fullererde abfiltriert und die Adsorption mit der halben Menge Fullererde wiederholt. Das von der Fullererde befreite Filtrat wurde neutralisiert und eingedampft (= Fullererdefiltrat). Die Fullererde der beiden Adsorptionen wurde in n/5 Bariumhydroxydlösung bei 70—80° 40 Min. eluiert, die Fullererde abfiltriert und das Barium mit Schwefelsäure als Bariumsulfat gefällt. Nach dem Neutralisieren wurde das vom Bariumsulfat befreite Filtrat eingedampft (= Fullererdeeluat).

Auch hier wurden die Fütterungsversuche mit der Grundkost:

Mgdt. + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe + 8 γ B_1 + 6 γ B_2

ausgeführt und dazu als B_x das Fullererdefiltrat, das Fullererdeeluat oder die Kombination der beiden Produkte in verschiedenen Mengen zu der Nahrung zugegeben.

Die Resultate dieser Versuchsreihen ergaben folgendes Bild: Wenn Fullererdefiltrat als B_x gegeben wurde, wuchsen die Tiere sehr langsam bis zu einer Größe von höchstens 5 mm und kamen nie zur Verpuppung. Wurde Fullererdeeluat an Stelle des B_x gefüttert, so kamen auch nur selten Tiere zur Verpuppung, und wurden nun beide Produkte, in verschiedenen Mengen kombiniert, statt B_x gegeben, so erhielt ich doch beträchtlich bessere Werte. Aber auch hier dauerte die Entwicklung bis zur Puppe etwa 40 Tage und länger. Werte unter 35 Tagen wurden nie erhalten. Diese Resultate deuten aber doch darauf hin, daß der B_x-Faktor komplexer Natur zu sein scheint.

Die Entwicklungsverzögerung führte ich zunächst wieder auf eine Überdosierung hauptsächlich von Vitamin B_2 zurück, da ja der Hefeextrakt auch reichlich B_2 enthält. Daß B_2 von Fullererde adsorbiert (Bomskov) und sicher wenigstens zum Teil auch durch das Bariumhydroxyd eluiert wird, steht fest. Aus diesem Grunde verwandte ich in den nun folgenden Versuchen die schon beschriebene B_x-Lösung, die die wasserlöslichen Teile des NaOH-Filtrates enthält. Diese Lösung wurde ebenfalls mit Fullererde adsorbiert und Filtrat und Bariumhydroxydeluat verfüttert. Die hiermit erzielten Ergebnisse waren aber noch bedeutend schlechter, als wenn ich mit Hefeextrakt als Ausgangslösung arbeitete. Es kann nun einerseits möglich sein, daß die richtige Dosierung der verschiedenen Stoffe der künstlichen Nahrung nicht richtig getroffen wurde, was ich aber bezweifle, da ich diese Fehlerquelle durch verschiedenste Mengen der das B_x enthaltenden Stoffe auszuschalten versuchte. Vielmehr neige ich zu der Ansicht, daß es sich bei B_x tatsächlich um einen Faktor komplexer Natur handelt und daß es mit Hilfe des Bariumhydroxyds nicht restlos gelang, alle aktiven Stoffe, die an Fullererde adsorbiert werden, zu eluieren.

Dahingehend dürften auch die Ergebnisse mit Leberextrakt zu deuten sein. Der Leberextrakt enthält ja, wie schon bewiesen wurde, ebenfalls das B_x. Die Ergebnisse, die hier durch Adsorption mit Fullererde erhalten wurden, waren auch nicht besser als die mit den Hefeprodukten. Die Annahme einer komplexen Natur des B_x läßt die Möglichkeit zu, daß diese beiden B_x-Faktoren jenen Faktoren entsprechen, die Macrae und Edgar als für Ratten nötige Faktoren festgestellt haben. Sie gingen dabei auch von Hefelösungen aus, die mit Fullererde absorbiert und mit Bariumhydroxyd eluiert wurden. Sowohl das Fullererdefiltrat als auch das Fullererdeeluat enthalten für Ratten nötige Faktoren.

Aus alledem gehen die großen Schwierigkeiten hervor, welche sich zur Zeit bei einer eindeutigen Definition der Komponenten des B_x-Faktors ergeben. Die Fütterungsversuche an *Tribolium* lassen vorerst noch keinen sicheren Schluß ziehen, um welche Stoffe es sich dabei handelt, und ob dieselben eventuell mit Vitamin B_5, P.P.-Faktor und Filtratfaktor, die als Stoffe bestimmter physiologischer Wirkung bei manchen Tieren festgestellt wurden, identisch sind. Auch die Frage, ob der Antiblacktonguefaktor oder das Vitamin B_6 als Komponente im B_x vorhanden sind, ist noch nicht geklärt.

Manches spricht dafür, daß doch das Vitamin B_6 in den von mir verwendeten Diäten vorhanden sein muß, denn B_6 wird von Fullererde adsorbiert (Elvehjem, Ammon-Dirschel, Brockmann-Maier), und es kommt außer in Hefe auch z. B. in Leber vor (Elvehjem). Weiterhin kann der im Fullerfiltrat vorhandene Faktor mit dem von Lepkovsky gefundenen sog. Filtratfaktor identisch sein. Diese Vermutungen werden in augenblicklich noch in Gang befindlichen Untersuchungen nachgeprüft.

Anhangsweise möchte ich noch bemerken, daß im wässerigen Hefeextrakt, der auf ein $p_H = 9{,}5$ gebracht wurde, die B_x-Wirkung nach 1,5stündigem Kochen sehr geschwächt wurde, so daß nur ganz langsames Wachstum und ganz langsame Entwicklung stattfanden, wenn das Eindampfungsprodukt dieses so behandelten Hefeextraktes an Stelle des B_x verfüttert wurde (etwa 65 Tage bis zur Verpuppung).

Zu erwähnen ist schließlich noch, daß B_x auch in 70%igem Alkohol löslich ist, denn mit 70%igem Alkohol hergestellte Hefeextrakte waren stets B_x-aktiv.

Damit möchte ich den Bericht über die Versuche, welche eine Aufklärung des B_x-Komplexes zum Ziele hatten, schließen, und wir wollen uns nunmehr der wasserunlöslichen Wachstumskomponente der Hefe zuwenden.

Untersuchung des im wasserunlöslichen Teil der Hefe befindlichen Wachstumsfaktors.

Im folgenden seien nun die Versuche geschildert, die zur Aufklärung des im wasserunlöslichen Teil der Hefe befindlichen aktiven Prinzips dienten.

Zunächst sei daran erinnert, wie die Versuche aussahen, die zu seiner Entdeckung führten und die auf S. 345 geschildert wurden. Sie lauteten kurz:

1. Mgdt. + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe + 2% wässeriger Hefeextrakt = gutes Wachstum.

2. Mgdt. + 4% wässeriger Hefeextrakt = sehr langsames Wachstum. Entwicklung bis zur Imago möglich.

Im Hefeextrakt müssen also Spuren des wasserunlöslichen Faktors enthalten sein, die ausreichen, um eine volle — wenn auch äußerst

langsame — Entwicklung zu gewährleisten. Zur Prüfung des Empfindlichkeitsgrades der Reaktionsfähigkeit der *Tribolium*-Larven auf diesen unbekannten unlöslichen Faktor wurde folgender Versuch angesetzt:

1. Mgdt. + 0,2% wasserunlöslicher Teil der Hefe + 2% Hefeextrakt.

Zum Vergleich:

2. Mgdt. ohne wasserunlöslichen Teil der Hefe + 2% Hefeextrakt.

	Wachstumsergebnis nach	
	18 Tagen	45 Tagen
Versuch 1	5 mm	1. Puppe
Versuch 2	3 mm	1. Puppe

Aus dem Ergebnis folgt, daß trotz der geringen Menge des Zusatzes des unlöslichen Faktors von 0,2% in Form des nichtwasserlöslichen Anteils der Hefe das Wachstum ganz gut ist, wenn sich auch die Verpuppung sehr verzögert. Zur Untersuchung des nicht wasserlöslichen Faktors mußte also unbedingt die Kost bestehend aus:

Mgdt. + 2% Hefeextrakt

genügen, wenn ich dazu die Substanzen zusetzte, die den unlöslichen Faktor enthalten sollten. Wie eben bewiesen, genügten ja schon Spuren davon, um den damit erzielten Wachstumserfolg vom Wachstum mit Hefeextrakt allein zu unterscheiden.

Als Ausgangsmaterial für die chemischen Untersuchungen diente die erschöpfend (7—8mal) mit kochendem Wasser extrahierte Hefe in getrocknetem Zustand. Zunächst wurde durch oftmals wiederholte Extraktionen mit Äthyläther, Aceton, Petroläther, Benzol und Methyl- und Äthylalkohol verschiedenster Konzentration der Versuch gemacht, das aktive Prinzip des wasserunlöslichen Teiles der Hefe in Lösung zu bringen, was aber nicht gelang, denn immer blieb der Rückstand voll aktiv, während der Extrakt fast inaktiv war.

Gleichzeitig mit diesen Versuchen ging ich daran zu prüfen, ob das aktive Prinzip eines der fettlöslichen Vitamine sei. Ich gab also an Stelle des wasserunlöslichen Teiles der Hefe verschiedene Dosen der Vitamine A, D und E und verschiedene Kombinationen derselben. Es war aber kein besseres Wachstum als mit Hefeextrakt allein zu beobachten.

Bomskov beschreibt noch ein sog. fettlösliches Wachstumsvitamin, das von Ratten benötigt werden soll. Es ist durch Extraktion von gewöhnlichem Casein mit Äthyläther zu gewinnen. Ich stellte mir auch davon ein Konzentrat her und prüfte, ob es, an Stelle des wasserunlöslichen Teiles der Hefe gefüttert, aktiv sei, aber auch hier ohne Erfolg.

Wie einleitend schon ausgeführt, hatte Hobson bei Fliegenlarven *(Lucilia sericata)* Cholesterin als Wachstumsfaktor beschrieben. Weiterhin hatte van't Hoog bei *Drosophila* Ergosterin und andere Sterine als lebensnotwendige Nahrungsfaktoren erkannt. Es lag also nahe, auch bei *Tribolium* das gleiche zu vermuten, zumal ja bekannt ist, daß die Hefe Ergosterin enthält.

Ich fütterte also folgende Diäten:

Mgdt. + 2% Hefeextrakt + versch. Dosen Ergosterin (100 γ bis 3 mg),
Mgdt. + 2% „ + „ „ Cholesterin (100 γ bis 3 mg).

Der Erfolg dieser Versuche entsprach nicht meinen Erwartungen. Nur bei höheren Gaben konnte man ein kaum merklich besseres Wachstum als ohne Zusatz des unlöslichen Faktors beobachten. Diese Feststellung war überhaupt nur möglich durch die bei langem Arbeiten mit diesen Tieren gewonnene Erfahrung. Erst bei der Verpuppung traten etwas bessere Unterschiede zutage, dadurch, daß dieses Stadium einige Tage früher erreicht wurde, als wenn nur Hefeextrakt allein mit der Mangeldiät verfüttert wurde. Die Ergebnisse waren aber keinesfalls überzeugend.

So mußte ich versuchen, auf andere Weise diesem Faktor beizukommen, indem ich den wasserunlöslichen Teil der Hefe der Verseifung mit starker Kalilauge unterwarf. Nebenbei wurde auch Erdnußöl, das ja Sterine enthält, dem gleichen Prozeß unterzogen. Das Unverseifbare dieser beiden Verseifungen wurde nun in verschiedener Dosierung an Stelle des wasserunlöslichen Teiles der Hefe verfüttert. Das Ergebnis war annähernd dasselbe wie bei den oben beschriebenen Ergosterin- und Cholesterinversuchen, nämlich ein wenig besseres Wachstum und eine etwas früher erfolgende Verpuppung.

Somit mußte ich annehmen, daß das aktive Prinzip im wasserunlöslichen Teil der Hefe komplexer Natur ist, d. h. daß hier mindestens zwei Faktoren vorliegen, die für *Tribolium* nötig sind und von denen einer ein Sterin sein könnte. Das etwas bessere Wachstum bei den vorstehenden Versuchen mit Ergosterin und Cholesterin kann damit erklärt werden, daß durch die Mehrzufuhr dieser Stoffe gewisse optimale Ernährungsbedingungen geschaffen wurden. Zu Beginn dieser Untersuchungen hatte ich vergeblich versucht, das aktive Prinzip mit Fettlösungsmitteln ganz oder teilweise aus dem wasserunlöslichem Teil der Hefe zu extrahieren.

Ich ging deshalb nun daran, andere Ausgangsstoffe als Hefe zu suchen, in denen der oder die aktiven Faktoren vorkommen, um dort dann zu versuchen, mit Fettlösungsmitteln aktive Extrakte zu erhalten. So wurde zunächst Lebertran zur Kost:

Mgdt. + 2% Hefeextrakt

zugegeben. Es ließ sich aber nur ein Wachstum, wie es ohne wasserunlöslichen Teil der Hefe auch beobachtet wurde, erzielen. Etwas günstiger verliefen die Ergebnisse, wenn zur Diät

Mgdt. + 2% Hefeextrakt

geschmolzene Butter zugesetzt wurde. Die Ergebnisse waren aber auch nicht recht befriedigend.

Einwandfrei positive Ergebnisse erzielte ich dagegen mit Kalbsleber. Darüber geben die folgenden Versuche Aufschluß:

1. Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 0,5 g frische Kalbsleber.

Wachstumsergebnis nach		
16 Tagen	23 Tagen	29 Tagen
5 mm	etwa 6,5 mm	zum größten Teil verpuppt

2. Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 2% mit essigsaurem Wasser extrahierte Leber.

Wachstumsergebnis nach	
17 Tagen	24 Tagen
etwa 7 mm	z. T. Imagines z. T. Puppen

Kalbsleber enthält also vollkommen das aktive Prinzip des wasserunlöslichen Teiles der Hefe.

Ebenfalls zu positiven Resultaten führte die Untersuchung des Hühnereigelbs. Das Eigelb wurde im Trockenschrank bei 45° getrocknet und in der folgenden Diät verfüttert.

Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 2% getrocknetes Eigelb

Wachstumsergebnis nach	
17 Tagen	28 Tagen
etwa 5 mm	6—7 mm 1. Puppe

Das Eigelb enthält also ebenso wie der wasserunlösliche Teil der Leber die aktiven Faktoren des nicht wasserlöslichen Anteils der Hefe.

Mit Hilfe des Eigelbs gelang es nun zunächst, die Komplexnatur des aktiven Prinzips im wasserunlöslichen Teil der Hefe eindeutig zu beweisen.

Das Eigelb wurde mehrmals mit Äthyläther extrahiert und die vereinigten Extrakte eingedampft. Der in Äther nicht lösliche Teil wurde getrocknet. Mit diesen Produkten setzte ich die folgenden Versuche an:

1. Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 2% mit Äther extrahiertes Eigelb.
2. Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 2% Ätherextrakt aus Eigelb.
3. Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 1,5% mit Äther extrahiertes Eigelb + 0,5% Ätherextrakt aus Eigelb.

	Wachstumsergebnis nach		
	12 Tagen	17 Tagen	24 Tagen
Versuch 1	bis 4 mm	4—5,5 mm	5—6,8 mm
Versuch 2	4 mm	5—5,5 mm	5,5—7 mm
Versuch 3	5 mm	6,5—7,5 mm	verpuppt

Diese Versuche zeigen schon mit großer Deutlichkeit, daß hier zwei aktive Prinzipien eine Rolle spielen, nämlich eines, das in Äther löslich ist, und eines, das nicht mit Äther aus dem Eigelb extrahiert werden kann.

Im ätherlöslichen Teil vermutete ich nun ein Sterin als aktive Substanz und folgender Versuch gab mir darin recht:

Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 2% mit Äther extrahiertes Eigelb + 500 γ Ergosterin (s. folgende Tabelle).

Wachstums- und Entwicklungsgeschwindigkeit sind also noch größer als im Versuch 3 auf S. 366.

Wachstumsergebnis nach		
12 Tagen	17 Tagen	24 Tagen
4—6,5 mm	Schon 3 Puppen	4 Imagines und Puppen

Es kann also kein Zweifel darüber bestehen, daß das aktive Prinzip des wasserunlöslichen Teiles der Hefe als Komponente Ergosterin enthält. Ich versuchte nun den Beweis hierfür noch eindeutiger zu führen, denn mich störte die Tatsache, daß bei einer Kost bestehend aus:

Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 2% mit Äther extrahiertes Eigelb

noch ein langsames Wachstum erfolgte. Dabei war zu berücksichtigen, daß der eine Bestandteil der Mangeldiät Erdnußöl ist. Das Öl enthält aber in geringer Menge Ergosterin, und dieses war wahrscheinlich für das immerhin recht deutliche Wachstum in dieser letztgenannten Kost verantwortlich zu machen.

Quantitative Untersuchung der Ergosterinwirksamkeit.

Deshalb wurde in der folgenden Versuchsreihe, die gleichzeitig auch den quantitativen Bedarf des Tieres an Ergosterin aufklären sollte, fettfreie Mangeldiät verwendet. Die 3% Erdnußöl, die sonst in der Diät enthalten waren, wurden durch Wasser ersetzt.

Versuche über den quantitativen Bedarf an Ergosterin.

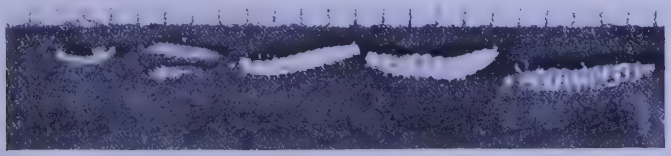
Grunddiät:

fettfreie Mgdt. + 1% mit Äther extrahiertes Eigelb + 2% Hefeextrakt.

Tabelle 10.

		Wachstumsergebnis nach 17 Tagen
1. Grunddiät	ohne Ergosterin	2—3 mm
2. Grunddiät	+ 10 γ Ergosterin	2—3,5 mm
3. Grunddiät	+ 100 γ Ergosterin	5,3—6,5 mm
4. Grunddiät	+ 500 γ Ergosterin	5,5—6,8 mm
5. Grunddiät	+ 1 mg Ergosterin	6—7 mm

Die Abb. 4 zeigt Durchschnittstiere aus jeder der obenstehenden Diäten im Alter von 17 Tagen.



ohne Ergosterin | 10 γ Ergosterin | 100 γ Ergosterin | 500 γ Ergosterin | 1 mg Ergosterin

Abb. 4. Die für die Tiere angegebenen Ergosterinwerte beziehen sich auf die Ergosterinmengen, die jeweils zu der Kost: fettfreie Mgdt. + 1% mit Äther extr. Eigelb + 2% Hefeextrakt zugesetzt wurden. Die Tiere sind 17 Tage alt.

Aus dieser Versuchsreihe geht hervor, daß erstens in der Kost mit erdnußölhaltiger Mangeldiät tatsächlich das Erdnußöl für das verhältnismäßig gute Wachstum auch ohne Zusatz von Ergosterin oder Ätherextrakt des Eigelbs verantwortlich zu machen ist und daß zweitens schon mit etwa 100 γ Ergosterin das maximale Wachstum erreicht ist, während bei Zugabe von 10 γ Ergosterin nur einige Tiere ein sehr langsames Wachstum zeigen, das nur bei wenigen Tieren erst nach sehr langer Zeit zur Verpuppung führt. Genauer besehen gibt natürlich die Tabelle 10 für 500 γ und 1 mg Ergosterin besseres Wachstum an. Man muß sich aber klar machen, daß es nicht leicht ist, 100 γ eines Stoffes mit Hilfe von Reibschale und Pistill in 1,5 g Diät gleichmäßig zu verteilen. Bei Gaben von 500 γ und 1 mg Ergosterin ist aber die Wahrscheinlichkeit, daß die Tiere diesen Stoff aufnehmen, bedeutend größer.

Eine entsprechende Versuchsreihe wurde nun mit Zusätzen von Cholesterin statt des Ergosterins angesetzt.

Als Grunddiät kommt wieder die folgende Kost zur Verwendung:

fettfreie Mgdt. + 1% mit Äther extrahiertes Eigelb + 2% Hefeextrakt.

In Tabelle 11 führe ich die Ergebnisse dieser Versuche an:

Tabelle 11.

		Wachstumsergebnis nach 17 Tagen
1. Grunddiät	ohne Cholesterin	2—3 mm
2. Grunddiät	+ 10 γ Cholesterin	2,5—3,5 mm
3. Grunddiät	+ 100 γ Cholesterin	4,5—5,8 mm
4. Grunddiät	+ 500 γ Cholesterin	5,5—7 mm
5. Grunddiät	+ 1 mg Cholesterin	5,5—7,5 mm

Erstens ergibt sich aus dem Resultat, daß an die Stelle des Ergosterins auch das Cholesterin treten kann, und weiterhin dürfte die Dosis, die für maximales Wachstum notwendig ist, auch etwa bei 100 γ liegen.

Nach diesen Befunden dürfte man diese Sterine in bezug auf ihre physiologische Wirksamkeit nicht ohne weiteres als Stoffe mit Vitamincharakter bezeichnen, denn bei den Vitaminen B_1 und B_2 wurden ja Optimaldosen von etwa 6 γ festgestellt. Die Größenordnung der optimalen Wirksamkeit der Sterine liegt aber erheblich höher. SCHLIEPER führt z. B. an, daß die Möglichkeit besteht, daß bei den niederen Tieren das Cholesterin die Funktion des Vitamins D übernimmt.

Ersatz des Ergosterins durch das Vitamin D-Präparat „Vigantol".

Hier muß noch ein Versuch erwähnt werden, der zunächst die Möglichkeit zuließ, daß Vitamin D bei *Tribolium* wirksam ist.

Zu der Diät:

Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 1% mit Äther extrahiertes Eigelb

wurden statt des Ergosterins 2 Tropfen Vigantol gegeben. Das in dieser

Kost erfolgreiche Wachstum war genau so gut wie in der Diät, die statt des Vigantols 1 mg Ergosterin enthielt, d. h. es fand optimales Wachstum statt.

Nun ist aber das Vigantol ein Präparat, das Vitamin D_2 in Sesamöl gelöst enthält. Es ließ sich deshalb vermuten, daß das Sesamöl, das Sterine enthält, schon allein diese Wachstumswirkung hat. Diese Vermutung wurde durch eine Versuchsreihe nachgeprüft. Zu der Kost:

Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 1% mit Äther extrahiertes Eigelb

wurde zugegeben:

1. 1 kleiner Tropfen Sesamöl,
2. 1 kleiner Tropfen Vigantol (enthält etwa 5 γ D_2),
3. 3 kleine Tropfen Sesamöl,
4. 3 kleine Tropfen Vigantol (enthält etwa 15 γ D_2).

Schon nach 11 Tagen konnte einwandfrei festgestellt werden, daß die Tiere in Versuch 1 und 2 sowie in Versuch 3 und 4 gleich groß waren, daß also das Sesamöl allein dieselbe Wirkung hat wie das Vigantol, das das Vitamin D_2 in Sesamöl gelöst enthält. Nach 17 Tagen konnte festgestellt werden, daß die Tiere im Versuch 4 durchschnittlich 0,5 mm kleiner waren als die Tiere des Versuches 3, so daß hier eine schwache toxische Wirkung durch Überzufuhr an Vitamin D_2 angenommen werden muß.

Abschließend läßt sich also über die Versuche sagen, daß das Vitamin D_2 keinesfalls die physiologische Funktion des Ergosterins übernehmen kann. Die Wirksamkeit des Vigantols im *Tribolium*versuch muß lediglich den Sterinen des Sesamöls zugeschrieben werden.

Untersuchung der zweiten aktiven Komponente im wasserunlöslichen Teil der Hefe. Faktor U.

In der Folge beschreibe ich die Untersuchungen, die zur Erforschung des zweiten aktiven Faktors unternommen wurden. Er kommt neben Ergosterin im wasserunlöslichen Teil der Hefe vor. Es handelt sich um den Faktor, der in Form des mit Äther extrahierten Eigelbs zu den Diäten bei den Sterinuntersuchungen zugegeben werden mußte, um Wachstum und Entwicklung zu gewährleisten. Er kommt, wie aus allen Versuchen zu ersehen ist, in Hefe, Leber, Eigelb, Eiklar und Mehl vor. Daß er in sehr kleinen Mengen wirksam ist, beweist die Tatsache, daß 1% mit Äther extrahiertes Eigelb in den Versuchen genügte, um gute Ernährungsbedingungen zu schaffen.

Für die Untersuchungen wurde die Kost:

Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 500 γ Ergosterin

genommen, denn hier mußte sich bei Zugabe des noch fehlenden aktiven Faktors U gutes Wachstum zeigen, während ohne ihn nur sehr langsame Entwicklung möglich ist, wie ja schon früher ausgeführt wurde.

Zunächst wurde versucht, den Faktor U mit einem schon bekannten Wirkstoff zu identifizieren. Ich dachte an das von GYÖRGY beschriebene Vitamin H, das für normale Beschaffenheit und Funktion der Haut der Säugetiere notwendig ist und für den Fett- und Eiweißstoffwechsel unentbehrlich sein soll. Nach Angaben dieses Autors soll es weder in Wasser noch irgendwelchen anderen Lösungsmitteln löslich sein, was auch für den Faktor U zutrifft. Es kommt gleichfalls in Hefe und Leber vor, wogegen es in Weizenmehl nicht vorhanden sein soll. Obwohl meine Erfahrungen an *Tribolium* sich nicht ganz mit obigen Angaben decken — *Tribolium* gedeiht ja in Weizenmehl recht gut — führte ich doch Versuche durch, die die Wirkung des Vitamins H im *Tribolium*-Versuch erproben sollten. Es wäre ja möglich, daß doch Spuren davon in Weizenmehl vorkommen, die nur mit einem so empfindlichen Testobjekt, wie es *Tribolium* ist, nachgewiesen werden können. Das Vitamin H ist nun nur durch Papainhydrolyse in den wasserlöslichen Zustand zu bringen. Diese Papainhydrolyse wurde auch ausgeführt. Der wasserunlösliche Teil der Hefe wurde in Wasser suspendiert und die Suspension mit verdünnter Salzsäure auf $p_H = 5$ gebracht. Dazu wurde etwas Glutathion gegeben (LEHNARTZ), da die Gegenwart von freien SH-Gruppen zur Aktivierung des Fermentes bei dieser Hydrolyse erforderlich ist. Nach 24stündiger Einwirkung auf das Substrat bei 32^0 wurde die Lösung filtriert, neutralisiert und eingedampft. Der Rückstand gab aber als Faktor U verfüttert keinen Wachstumserfolg.

Nun war aber noch die Möglichkeit zu erwägen, daß dieser Faktor ein Eiweißkörper bzw. eine Aminosäure ist, die im vitaminfreien Casein, das immer als Eiweißquelle verfüttert wurde, nicht vorkommt. Im gewöhnlichen Casein fehlt das Glykokoll und Cystin kommt nur in Spuren darin vor. Beide Aminosäuren wurden deshalb an Stelle von Faktor U verfüttert. Der Wachstumserfolg blieb aber aus. Daraufhin setzte ich Tryptophan zu, das im Casein vorhanden ist und dessen Wichtigkeit für die Wachstumsvorgänge bekannt ist. Es wäre ja möglich, daß der Tryptophangehalt des vitaminfreien Caseins durch den Reinigungsprozeß bei der Herstellungstechnik gelitten hat. Aber auch hier war der Erfolg gleich Null. Neuerdings versuchte ich den Faktor U dadurch auszuschalten, daß ich statt des vitaminfreien Caseins vitaminfreien Weizenkleber als Eiweißquelle in der Mangeldiät verfütterte. Aber auch im Weizenkleber kommt dieser Faktor nicht vor.

Ferner wurde versucht, durch Hydrolyse des wasserunlöslichen Teiles der Hefe mit verdünnter und konzentrierter Salz- und Schwefelsäure den Faktor U in Lösung zu bringen. Auch hier sind die Fütterungsversuche ergebnislos verlaufen, und die Frage nach der Natur dieses aktiven Prinzipes, das für das Gedeihen von *Tribolium* unbedingt wichtig ist, muß noch gelöst werden.

Sicherheitshalber wurde auch Vitamin A in Form des Präparates Vogan an Stelle von Faktor U verfüttert, da Vitamin A ebenfalls in Hefe in geringen Mengen vorkommen soll (Rudy). Aber auch bei diesem Fütterungsversuch blieb der Wachstumserfolg aus. Als Eigenschaften des Faktors U kann ich noch anführen, daß er sehr alkalistabil ist, daß er aber durch Kochen mit Wasserstoffsuperoxyd zerstört wird.

Alle diese Versuche sollten dazu beitragen einen Überblick über die für die Entwicklung und das Wachstum von *Tribolium* unentbehrlichen Wirkstoffe der Nahrung zu vermitteln.

Es gilt nun in einigen weiteren Experimenten die

V. Frage der Vitaminspeicherung (B_1 und B_2)

bei diesem Tier zu prüfen. Über die Speicherung von B-Vitaminen im tierischen Organismus ist nichts Genaueres bekannt (Glanzmann 1938). Man kann durch Verfütterung von Organen und Organextrakten als Vitaminquelle einiges über das Vorhandensein dieser Stoffe aussagen.

Bei *Tribolium* wurden nun zur Klärung der Frage, ob diese Organismen die Vitamine B_1 und B_2 speichern können, die folgenden Versuche unternommen, die sich auf die Diäten bei den quantitativen B_1- und B_2-Untersuchungen gründen.

3 Parallelversuche wurden angesetzt, in denen die Tiere zunächst in allen 3 Tuben die Kost:

$$\text{Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1 + 6\,\gamma\ B_2$$

erhielten. Nach 15 Tagen wurden die Tiere herausgelesen und in neue Diäten von folgender Zusammensetzung gebracht:

1. (zur Kontrolle)

$$\text{Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1 + 6\,\gamma\ B_2.$$

2. (ohne B_1)

$$\text{Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 6\,\gamma\ B_2.$$

3. (ohne B_2)

$$\text{Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1.$$

Nun mußte sich zeigen, ob die Vitamine B_1 und B_2 gespeichert worden sind oder ob jetzt Wachstumshemmung eintrat. Das Ergebnis sah nun so aus, daß die Tiere im Versuch 1 selbstverständlich weiterwuchsen, aber auch im Versuch 2, in dem das B_1 entzogen wurde, trat keinerlei Entwicklungsverzögerung ein. Im Versuch 3 dagegen fand eine beträchtliche Verzögerung des Wachstums und der Entwicklung statt, so daß überhaupt nur 2 Tiere sehr spät zur Metamorphose kamen, während die

anderen starben. Demzufolge muß angenommen werden, daß soviel B_1 in den Geweben gespeichert wurde, daß es zu einer normalen Entwicklung ausreichte, während das Vitamin B_2 nicht oder nur in sehr geringen Mengen gespeichert werden kann. Es gibt vielleicht auch bei diesen Tieren Organe, wo das Laktoflavin, wie in der Retina der höheren Tiere, in geringen Mengen vorkommt und von wo es dann für den Stoffwechsel mobilisiert werden kann.

VI. Heilung von B_1- und B_2-Avitaminosen.

Im Anschluß an diese Versuche möchte ich noch kurz über die Untersuchungen berichten, die ausgeführt wurden, um festzustellen, ob Tiere, die zunächst mit einer Nahrung gefüttert wurden, in der eines der beiden B-Vitamine — B_1 oder B_2 — fehlte und die deshalb nicht wuchsen, durch späteren Zusatz dieses Vitamins wieder ausgeheilt werden könnten. Es wurde also gefüttert.

$$1.\ \text{Mgdt.} + 2\,\%\ \frac{\text{NaOH-F.R.}}{\text{v. 5 g Hefe}} + 2\,\%\ \frac{\text{NaOH-Filtrat}}{\text{v. 5 g Hefe}} + 8\,\gamma\ B_1.$$

$$2.\ \text{Mgdt.} + 2\,\%\ \frac{\text{NaOH-F.R.}}{\text{v. 5 g Hefe}} + 2\,\%\ \frac{\text{NaOH-Filtrat}}{\text{v. 5 g Hefe}} + 6\,\gamma\ B_2.$$

Nach 17 Tagen wurden die Tiere, die jetzt noch lebten und die nicht gewachsen waren, in eine Kost:

$$\text{Mgdt.} + 2\,\%\ \frac{\text{NaOH-F.R.}}{\text{v. 5 g Hefe}} + 2\,\%\ \frac{\text{NaOH-Filtrat}}{\text{v. 5 g Hefe}} + 8\,\gamma\ B_1 + 6\,\gamma\ B_2$$

übergeführt, die also beide B-Vitamine enthält und vollwertig ist. Dabei konnte festgestellt werden, daß die meisten der im Wachstum stark zurückgebliebenen Tiere sich wieder erholten und, mit entsprechender Verzögerung natürlich, zur vollen Entwicklung kamen. Es ist also eine Heilung der beiden B-Avitaminosen möglich.

Wie wirken sich nun diese Avitaminosen bei *Tribolium* aus? Kann man vielleicht außer der besonders sinnfälligen Wachstumshemmung und Entwicklungsverzögerung auch sonst noch irgendwelche Veränderungen am Organismus der geschädigten Larven nachweisen? Darüber können eventuell

VII. Histologische Untersuchungen.

nähere Auskunft geben. Nun war es leider im Rahmen dieser Arbeit technisch nicht möglich, neben der sehr zeitraubenden Versuchstechnik auch noch regelmäßig nebenherlaufende histologische Untersuchungen des Versuchsmaterials durchzuführen. Aber an einigen wenigen Tieren wollte ich doch eine Stichprobe machen, und so wählte ich für diese probeweise Untersuchung erstens Tiere, die B_1-frei, zweitens Tiere, die

B_2-frei und drittens Tiere, die B_x-frei ernährt wurden. Die B_1-frei ernährten Tiere erhielten eine Kost bestehend aus:

$$\text{Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 6\,\gamma\ B_2.$$

Die B_2-frei ernährten Tiere erhielten die Kost:

$$\text{Mgdt.} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-F.R.}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 2\% \begin{matrix}\text{NaOH-Filtrat}\\ \text{v. 5 g Hefe}\end{matrix} + 8\,\gamma\ B_1.$$

Die B_x-frei ernährten Tiere erhielten die Kost:

Mgdt. + 2% wasserunlöslichen Teil der Hefe + 8 γ B_1 + 6 γ B_2.

Die Tiere wurden am 17. Tage nach Dekapitieren in Bouin fixiert und dann in Längsschnitte (frontal) geschnitten. Aus den mit Hämalaun (Meyer) -Eosin gefärbten Präparaten glaube ich nun folgendes entnehmen zu können. Die B_2-frei ernährten Tiere zeigten histologisch, obwohl sie nicht gewachsen waren, ein durchaus normales Bild. Der Fettkörper ist, im Verhältnis zur Größe der Tiere, normal entwickelt. Die Fettzellen, aus denen er sich aufbaut, sind mit Lipoiden angefüllt was in einer regelmäßigen Anordnung der Vakuolen zum Ausdruck kommt (Abb. 5). Dieser Befund stimmt mit den Angaben in der Literatur überein, die besagen, daß bei B_2-Mangel immer nur Wachstumsstörung zu beobachten ist, während andere Mangelsymptome nicht festzustellen sind.

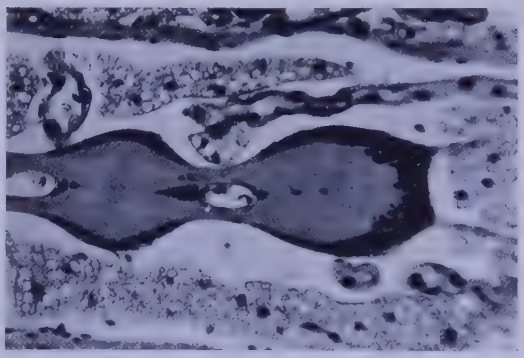


Abb. 5. Histologisches Bild der Ventralregion einer B_2-frei ernährten Larve.

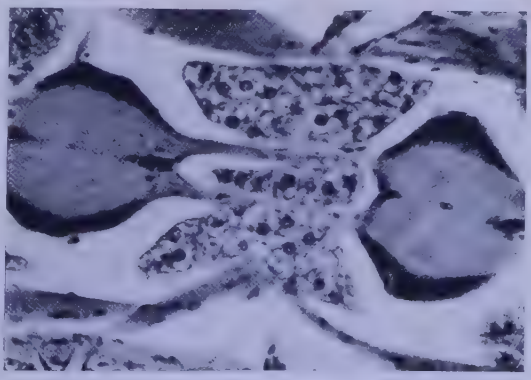


Abb. 6. Histologisches Bild der Ventralregion einer B_1-frei ernährten Larve.

Bei den B_1- und B_x-frei ernährten Tieren dagegen sind die Zellen des Fettkörpers kleiner und fettärmer. Im histologischen Bild kommt das

dadurch zum Ausdruck, daß die Kerne in den Fettkörperlobi näher zusammenrücken und so bei gleicher Schnittdicke eine wesentlich höhere Kernzahl in den Fettläppchen vorgetäuscht wird (vgl. Abb. 6 mit Abb. 5). Weitere Veränderungen an den verschiedenen Organsystemen von *Tribolium*, insbesondere am Nervensystem, sind mir nicht aufgefallen. Doch möchte ich bemerken, daß diese nur sehr flüchtigen Beobachtungen an einigen wenigen Tieren, die mehr zu meiner persönlichen Orientierung dienten, mit einiger Vorsicht gewertet werden müssen. Ich habe sie nur der Vollständigkeit halber hier noch mit angeführt. Doch glaube ich aus den wenigen Beobachtungen schon schließen zu können, daß eingehendere histologische Untersuchungen in dieser Richtung erfolgversprechend sind.

VIII. Zur Frage des Wachstumsvitamins.

Meine Feststellung, daß der Wegfall eines jeden einzelnen bei *Tribolium* aktiven Faktors mit Wachstumshemmung beantwortet wird, macht es nötig, mit einigen Worten wenigstens auf das Problem des sog. Wachstumsvitamins einzugehen.

In den Anfängen der Vitaminforschung war man geneigt, ein oder mehrere solcher für das Wachstum allein verantwortlich zu machender Vitamine anzunehmen. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen über Vitamine, die immer tiefere Einblicke in die physiologische Funktion dieser Stoffe gewährleistete, kam man aber zu dem Schluß, daß mit jedem Vitaminmangel eine Wachstumsstörung und dazu weiterhin eine Verminderung der Infektionsresistenz, die man zuerst lediglich dem Vitamin A-Mangel zuschrieb, Hand in Hand geht. Nach dem heutigen Stande der Forschung gibt es also kein spezifisches Wachstumsvitamin (Glanzmann 1938).

Mit diesen Erkenntnissen stimmen auch die Ergebnisse meiner Untersuchungen an *Tribolium* überein, denn bei den jeweils verwendeten Diäten, in denen nur ein Faktor fehlte, fand auch kein Wachstum statt. Wenn aber noch schwaches Wachstum festzustellen war, so muß dasselbe auf das Vorhandensein von Spuren dieser aktiven Stoffe zurückgeführt werden, denn die Tiere reagieren ja, wie auch verständlich, auf Anwesenheit von Spuren dieser Wirkstoffe.

IX. Zusammenfassung der an *Tribolium confusum* gewonnenen Ergebnisse.

Alle für *Tribolium* confusum nötigen Wachstumsfaktoren kommen in der mit Äthyläther extrahierten Hefe vor. Es konnte kein Bedarf an Fetten festgestellt werden. Die *Tribolium*-Larve vermag also die körpereigenen Fette vollständig aus den verfütterten Kohlehydraten zu synthetisieren.

Von den fettlöslichen Substanzen benötigt *Tribolium* nur das Ergosterin in der Nahrung. Das Ergosterin kann durch Cholesterin ersetzt werden. Die Mindestdosis dieser beiden Sterine beträgt für normales Wachstum etwa 100 γ/1,5 g Diät. Toxische Wirkung war auch bei Gaben bis zu 1 mg/1,5 g Diät nicht festzustellen.

Vitamin D_2 ist inaktiv, d. h. die Ergosterinwirkung kann nicht durch Vitamin D_2 ersetzt werden.

Von wasserunlöslichen Stoffen braucht *Tribolium* noch einen Stoff, den ich Faktor U nennen will, und dessen Natur nicht geklärt werden konnte. Er kommt in geringer Menge in Butter, in für *Tribolium* ausreichender Konzentration in Hefe, Kalbsleber, Eiklar und Eigelb vor. Er konnte nicht durch Fettlösungsmittel in Lösung gebracht werden, und es gelang auch nicht, ihn mit einem Eiweißkörper oder den Vitaminen H und A zu identifizieren.

Von den wasserlöslichen Vitaminen muß *Tribolium* unbedingt die Vitamine Aneurin (B_1) und Laktoflavin (B_2) in der Nahrung zugeführt bekommen. Schon bei einer Zufuhr von 6 γ B_1/1,5 g Diät erfolgt normale Entwicklung, und erst bei Gaben von etwa 500 γ B_1/1,5 g Diät läßt sich eine leichte Wachstumshemmung als Hypervitaminose feststellen.

Das Optimum der Laktoflavinwirkung liegt bei einer Zufuhr von etwa 6 γ B_2/1,5 g Diät. Hier wirkt aber schon eine Zugabe von 8 γ B_2/1,5 g Diät unbedingt toxisch, was sich in einer höheren Sterblichkeit der Tiere äußert. Bei 20 γ B_2/1,5 g Diät starben die Tiere schon nach wenigen Tagen. Es lassen sich also mit den Vitaminen B_1 und B_2 Hypervitaminosen durch Überzufuhr in der Nahrung erzeugen.

Außer diesen beiden bekannten wasserlöslichen Vitaminen ist für *Tribolium* noch ein weiterer wasserlöslicher Faktor nötig, den ich, da er in der Hefe vorkommt, wasserlöslich ist und höchstwahrscheinlich in die Gruppe der B-Vitamine einzuordnen ist, mit B_x bezeichnet habe. Es konnte nicht bewiesen werden, daß er mit einem der chemisch noch wenig erforschten Faktoren-Vitamin B_5, P.P.-Faktor, Filtratfaktor — identisch ist. Auch die Vermutung, daß B_x mit dem Vitamin B_6 oder dem Antiblacktonguefaktor (Nicotinsäureamid) identisch ist, bestätigte sich nicht.

B_x ist auch nicht mit dem H.G.-Faktor von Kollath identisch.

Der Faktor B_x kommt in Hefe, Mehl und Leber vor, aber weder im Eiklar noch im Eigelb von Hühnereiern konnte er nachgewiesen werden.

Von seinen chemischen Eigenschaften konnte festgestellt werden, daß er außer in Wasser auch in verdünntem Alkohol löslich ist. Er dialysiert durch eine Cellophanmembran, ist also anscheinend kleinmolekular und ist alkalistabiler als die Vitamine B_1 und B_2.

Aus wässerigem Hefeextrakt wird durch Fällung mit Bleiacetat nicht die gesamte B_x-Wirkung gefällt. Auch das Filtrat ist noch schwach

B_x-aktiv, wenn auch bei Verfütterung des Filtrates meist große Sterblichkeit zu verzeichnen ist.

B_x ist an Aktivkohle adsorbierbar und zum größten Teil mit 50% angesäuertem Alkohol daraus zu eluieren.

Bei Behandlung von Hefelösungen mit Fullererde zeigte es sich, daß wahrscheinlich B_x ein Faktor komplexer Natur ist und daß er eventuell aus zwei Komponenten besteht.

Untersucht wurde weiterhin, ob eine Speicherung der Vitamine B_1 und B_2 stattfindet. Die Ergebnisse besagen, daß B_1 zweifellos in ausreichender Menge gespeichert wird, während Laktoflavin höchstens in ganz geringen Spuren gespeichert werden kann.

Weitere Versuche ergaben, daß B_1- und B_2-Avitaminosen durch Zufuhr der fehlenden Vitamine geheilt werden können.

Die histologische Untersuchung B_1-, B_2- und B_x-frei ernährter Tiere ergab folgendes Bild: Die B_2-frei ernährten Tiere zeigten im Fettkörper keine Mangelsymptome, die B_1- und B_x-frei ernährten Tiere zeigten erheblich kleinere, fettarme Zellen des Fettkörpers.

Wie für Wirbeltiere bewiesen ist, besteht auch bei *Tribolium* kein Hinweis darauf, daß es ein spezifisches Wachstumsvitamin gibt.

Oryzaephilus surinamensis L. (Cucujidae.)

Nun wurde geprüft, ob die Berechtigung bestand, die an *Tribolium* gewonnenen Erfahrungen auf andere Insekten zu übertragen. Die Antwort konnte auch da nur das Experiment bringen, und ich sah mich nach einem zweiten Versuchsobjekt um, dessen Lebensweise es gestattete, die bei *Tribolium* angewendete Fütterungsmethode auch hier durchzuführen. In den engeren Kreis meiner Wahl kamen wiederum Getreideschädlinge. Als leicht züchtbares Objekt von kurzer Entwicklungsdauer erschien mir der Getreideplattkäfer *Oryzaephilus surinamensis*, von dem ich einige Kulturen im hiesigen Institut vorfand, geeignet.

Die Methodik der Eigewinnung war die gleiche wie bei *Tribolium*. Ich ließ die Tiere ihre Eier in Mehl ablegen und konnte bei 27° nach 4,5 Tagen, bei 32° nach 4 Tagen die jung geschlüpften Larven herauslesen.

Als Mangeldiät kam die auch bei *Tribolium* verwendete Mangeldiät, bestehend aus:

15% Casein (vitaminfrei),	3% Arachisöl,
70% Reisstärke (vitaminfrei),	7% Wasser.
5% Osborne-Mendel-Salzgemisch,	

zur Verwendung.

Wie durch den Versuch bewiesen wurde, gediehen die frisch geschlüpften Larven, welche in diese Mangeldiät eingesetzt wurden, nicht. Da das Optimum der Entwicklung von *Oryzaephilus* bei einer Temperatur von 26—28° liegen soll (Zacher 1927), wurden die ersten orientierenden Versuche in einem Thermostaten bei 27° durchgeführt. Für annähernde Konstanz der Feuchtigkeit wurde wieder durch Schälchen mit konzen-

trierter Kochsalzlösung, die im Thermostaten aufgestellt waren, gesorgt (etwa 60% Feuchtigkeit).

Bei der Wahl dieses Objektes aber war zu berücksichtigen, daß wir es hier — im Gegensatz zu *Tribolium* — mit einem Tier zu tun hatten, das eine intrazelluläre Symbiose eingegangen ist. Die Bakteriensymbionten, die in 4 Mycetomen untergebracht und durch Ovarialinfektion von Generation zu Generation weitergegeben werden, sind aber äußerst hitzelabil und gehen schon bei 32—33° zugrunde[1]. Bei den späteren Untersuchungen, in denen die Einzelfaktoren der Nahrung geprüft wurden, war es aber notwendig, immer Parallelversuche bei 27° mit symbiontenhaltigen Tieren und bei 32° mit symbiontenfreien Tieren zu unternehmen, um festzustellen, ob diese symbiontischen Bakterien eine ernährungsphysiologische Funktion erfüllen, wenn sie im Tier vorhanden sind.

Ich kann hier gleich vorwegnehmen, daß niemals ein Unterschied zwischen den symbiontenhaltigen Tieren und den bei 32° gehaltenen Tieren, die symbiontenfrei waren, festgestellt werden konnte.

Zunächst ergab sich, daß auch alle für *Oryzaephilus* nötigen Wachstumsfaktoren in Hefe vorkommen. Mgdt. + 5% Hefe gab ein normales Wachstum (etwa 20 Tage bis zur Verpuppung).

Wurde nun Mgdt. + 2% Hefeextrakt verfüttert, so fand nur langsames Wachstum statt, das aber schließlich auch zur Verpuppung führte (etwa 38 Tage bis zur Verpuppung). Erst bei Zusatz von wasserunlöslichem Teil der Hefe zu Mgdt. + 2% Hefeextrakt konnte wieder normales Wachstum hervorgerufen werden (etwa 24 Tage bis zur Verpuppung). Weiterhin verlief auch der Versuch zur Prüfung des Fettbedarfes:

fettfreie Mgdt. + 5% mit Äthyläther extr. Hefe

wie bei *Tribolium*, d. h. die Tiere wuchsen normal, und es besteht bei ihnen kein Bedarf an Fetten. Es werden höchstens solche Fettstoffe verwendet, die nicht mit Äther aus Hefe extrahierbar sind. Aus diesen Versuchen ließ sich schließen, daß die für Entwicklung und Wachstum von *Oryzaephilus* eine Rolle spielenden Faktoren ähnliche sind wie bei *Tribolium*.

Für die nächsten Versuche, die den Vitamin B_1- und B_2-Bedarf aufklären sollten, verwendete ich die bei den quantitativen Untersuchungen an *Tribolium* verfütterten Hefeprodukte, welche durch Behandlung der Hefe mit Natronlauge hergestellt worden waren.

[1] Hier muß hinzugefügt werden, daß Koch (1936) den Temperaturschwellenwert für den Verlust der Symbionten in der ersten Generation zwar als erst bei 32—33° liegend gefunden hatte, aber durch mündliche Mitteilung versicherte er mir, daß meine Tiere, die ich vor Beginn der Versuche 3 Monate im Thermostaten bei 32° hielt, so daß mehrere Generationen bei dieser Temperatur durchlaufen wurden, ihre Symbionten verloren haben mußten. Diese Behauptung bestätigte sich auch bei der histologischen Untersuchung einiger Larven, denn es war tatsächlich Symbiontenverlust eingetreten.

Folgende Versuchsreihe wurde mit diesen Produkten durchgeführt:

1. Mgdt. + 2% NaOH-F.R. v. 5 g Hefe + 2% NaOH-Filtrat v. 5 g Hefe + 8 γ B_1 + 6 γ B_2,

2. Mgdt. + 2% NaOH-F.R. v. 5 g Hefe + 2% NaOH-Filtrat v. 5 g Hefe + 6 γ B_2 ohne B_1.

3. Mgdt. + 2% NaOH-F.R. v. 5 g Hefe + 2% NaOH-Filtrat v. 5 g Hefe + 8 γ B_1 ohne B_2.

Im Versuch 1 gediehen die Tiere gut (etwa 25 Tage bis zur Verpuppung), während in den beiden Versuchen 2 und 3 nur sehr wenig Tiere nach sehr langer Zeit zur Metamorphose kamen (45 Tage). Die meisten Tiere starben aber.

Daraus folgt nun, daß *Oryzaephilus* sowohl Bedarf an Vitamin B_1 als auch Bedarf an Vitamin B_2 hat. Da es aber wenigen Tieren der Versuche 2 und 3 möglich war, das Puppenstadium zu erreichen, wenn auch erst nach langer Zeit, so läßt sich weiterhin schließen, daß die Tiere sehr spurenempfindlich sind, denn die *Tribolium*-Larven gediehen nicht mehr, wenn eines der Vitamine in diesen Kostformen entzogen wurde. Die Vitamin B_1- und B_2-Spuren im NaOH-Filtrat genügen also noch, um eine langsame Entwicklung bei *Oryzaephilus* zu ermöglichen.

Diese Versuche, die zur Prüfung des B_1- und B_2-Bedarfs unternommen wurden, wurden jeweils bei 27° und bei 32° durchgeführt, also mit symbiontenhaltigen und symbiontenfreien Larven. Auch alle folgenden Untersuchungen wurden bei 27° und 32° in Paralleldiäten ausgeführt.

Der B_x-Bedarf wurde wie auch bei *Tribolium* durch Fütterung mit der Kost:

Mgdt. + 2% wasserunlöslicher Teil der Hefe + 8 γ B_1 + 6 γ B_2

nachgewiesen, da in dieser Nahrung weder Wachstum noch Entwicklung stattfanden.

Für die Untersuchung des wasserunlöslichen Teiles der Hefe wurde die Kost:

fettfreie Mgdt. + 2% Hefeextrakt

zugrunde gelegt. Es zeigte sich nun hier eindeutig, daß statt des wasserunlöslichen Teiles der Hefe nur Ergosterin (etwa 100 γ) zugegeben zu werden brauchte, um normales Wachstum zu erhalten (etwa 23 Tage bis zur Verpuppung).

Damit war bewiesen, daß für *Oryzaephilus* kein Bedarf an Faktor U besteht, der für das Gedeihen von *Tribolium* unentbehrlich ist. Geprüft wurde der Befund noch durch zwei Parallelversuche mit den Diäten folgender Zusammensetzung:

1. fettfreie Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 1% mit Äther extrahiertes Eigelb + 500 γ Ergosterin.
2. fettfreie Mgdt. + 2% Hefeextrakt + 500 γ Ergosterin.

In beiden Diäten trat gleich schnelle und gleich gute Entwicklung ein, so daß gesagt werden kann, daß der Faktor U — gefüttert als 1% mit Äther extrahiertes Eigelb — für *Oryzaephilus* keine Rolle spielt, während Ergosterin zugeführt werden muß, denn wurde die Kost:

fettfreie Mgdt. + 2% Hefeextrakt oder
„ „ + 2% Hefeextrakt + 1% Eigelb (mit Äther extrahiert)

gefüttert, so konnte nur sehr langsames Wachstum festgestellt werden. Meist starben die Tiere in der letzten Diät ziemlich früh.

Zusammenfassung der Ergebnisse bei *Oryzaephilus surinamensis*.

Sämtliche für *Oryzaephilus surinamensis* nötigen Entwicklungsfaktoren kommen in der Hefe vor. Das Tier kommt auch ohne Fettzufuhr in der Nahrung aus, wenn mit Äther extrahierte Hefe in der Nahrung zugeführt wird. Der wasserunlösliche Teil der Hefe kann in synthetischer Kost durch Ergosterin ersetzt werden. Andere Sterine wurden nicht auf ihre physiologische Wirksamkeit geprüft.

Von den wasserlöslichen Faktoren hat *Oryzaephilus* einen Bedarf an Vitamin B_1, Vitamin B_2 und an einem weiteren wasserlöslichen Hefefaktor, dessen Identität mit dem für *Tribolium* nötigen B_x angenommen wird. Überraschend ist die Tatsache, daß bei diesem Tier, nach den Versuchsergebnissen zu urteilen, kein Bedarf an Faktor U besteht, der in der Nahrung von *Tribolium* unbedingt enthalten sein muß, damit die Tiere gedeihen können.

Tribolium und *Oryzaephilus* leben ja als Vorratsschädlinge unbedingt unter den gleichen ernährungsphysiologischen Bedingungen, und man müßte, obgleich sie zwar nicht derselben systematischen Familie angehören — *Tribolium* = *Tenebrionidae*, *Oryzaephilus* = *Cucujidae* — annehmen, daß ihr Bedarf an Nahrungsstoffen gleich ist. Wie aber die Untersuchungsergebnisse zeigen, ist es auch bei diesen Organismen nicht ohne weiteres zulässig, den Bedarf an akzessorischen Nährstoffen zu verallgemeinern.

Es sei auch hier noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen, daß ein Einfluß der Symbionten auf den Bedarf an Nahrungsfaktoren nicht festgestellt werden konnte.

Sitodrepa panicea. L. (Anobiidae.)

Gleichlaufend mit den Untersuchungen an *Oryzaephilus* wurde versucht, die Aufgabe der Symbionten im Körper solcher Insekten klarzustellen, die im Gegensatz zu *Oryzaephilus surinamensis* diese pflanzlichen Gäste beherbergen müssen. Werden diese Symbionten auf experimentellem Wege entfernt, so geht der Wirt zugrunde.

Für diese Versuche war der Brotkäfer, *Sitodrepa panicea*, in Aussicht genommen, der in seinen Mycetomen symbiontische Hefen beherbergt, deren Notwendigkeit für das Tier bewiesen ist (Koch 1933).

Die Untersuchungen konnten aber bisher aus Mangel an Tiermaterial nicht durchgeführt werden. Die Eigewinnung und die Züchtung der Stammkulturen gestaltet sich bei diesen Tieren bedeutend schwieriger als bei *Tribolium* und *Oryzaephilus*.

Blattella germanica.

Schließlich sollten auch noch die Blattiden in den Kreis dieser Untersuchungen einbezogen werden, und es wurden daher einige Versuche mit *Blattella germanica* durchgeführt, die aber mehr den Charakter von Stichproben hatten.

Dieses Objekt war schon mit Hilfe verschiedener Diäten von den amerikanischen Autoren R. M. Melampy und L. A. Maynard (1937) auf notwendige Nahrungsfaktoren geprüft worden. Sie stellten fest, daß diese Tiere, als Quelle für die akzessorischen Nährstoffe, Hefe zu der synthetischen Nahrung zugefüttert erhalten müssen. Die benötigten Hefefaktoren sollen hitze- und alkalistabil sein. Weiterhin wird ein fettlöslicher Stoff gebraucht, dessen Natur nicht geklärt ist.

Abb. 7 a und b. a Tiere gefüttert mit Mangeldiät + 10% Trockenhefe. b Tiere gefüttert mit Mangeldiät allein.

In meinen Versuchen verfütterte ich:

1. Mangeldiät (dieselbe, die auch bei *Tribolium* und *Oryzaephilus* zur Verwendung kam).
2. Mangeldiät + 10% Trockenhefe.

Die Tiere wurden im Thermostaten bei 27° und einer Luftfeuchtigkeit von etwa 80% gezüchtet. Nach 40 Tagen lag das Bild vor, wie es die Abb. 7 wiedergibt.

Wie man aus dieser Abbildung sieht, sind die Größenunterschiede zwischen den mit Mangeldiät allein und den mit Hefezusatz gefütterten Tieren nur zum Teil deutlich. Dieses Ergebnis kann man nur darauf zurückführen, daß es nicht einwandfrei möglich ist, in den Zuchtgefäßen den Kot zu entfernen. Der Kot aber ist durch die hohe Feuchtigkeit in den Zuchtbehältern ein ideales Kulturmedium für Schimmelpilze und Bakterien, die eventuell für eine Vitaminsynthese verantwortlich zu machen sind. Wenn die Schaben also mit Kot verunreinigte Nahrung aufnehmen, so könnte auf diese Weise wenigstens zum Teil der Vitaminmangel der Mangeldiät kompensiert werden. Allerdings sind diese Spekulationen durch keinen Versuch belegt.

Ich möchte hier nur noch anführen, daß die Tiere aus den beiden Diäten: Mangeldiät allein und Mangeldiät + 10% Trockenhefe, die nach 46 Tagen fixiert wurden, histologisch untersucht wurden. Es wäre ja naheliegend, daß die symbiontischen Bakterien, die bei den Blattiden in besonderen Mycetocyten der abdominalen Fettkörperlappen lokalisiert sind, durch die Zufuhr von wachstumsfördernden Substanzen in der hefehaltigen Nahrung eine besonders lebhafte Vermehrung zeigen

oder in Mangeldiät an Zahl abnehmen oder auch ein umgekehrtes Verhalten zeigen. Aber es gelang mir nicht, derartige Unterschiede aufzudecken.

C. Allgemeiner Überblick.

Wenn man alle bisher an Insekten ausgeführten Untersuchungen über ihren Bedarf an Vitaminen und Wachstumsfaktoren überblickt, muß man feststellen, daß allen untersuchten Insektenarten ein Vitamin B-Konzentrat zur Verfügung stehen muß. Weiterhin ist für einige dieser Tiere der Beweis erbracht worden, daß sie auch fettlösliche Stoffe benötigen. Es dürfte sich dabei wohl immer um Sterine handeln, wenn auch der Beweis erst in wenigen Fällen *(Lucilia, Drosophila, Tribolium, Oryzaephilus)* eindeutig geführt wurde. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht stellt anscheinend die Kleidermotte *(Tineola biselliella)* dar, die weder Fette noch fettlösliche Substanzen braucht. Ebenso muß man wohl den Bedarf von *Tribolium* an Faktor U als Ausnahme betrachten. Wie bei *Drosophila* konnte auch bei *Tribolium* die Sterinwirksamkeit nicht durch Vitamin D ersetzt werden.

Eine genauere Analyse über den Bedarf an verschiedenen B-Vitaminen ist nur in der Arbeit van't Hoogs an *Drosophila* und in meinen Untersuchungen an *Tribolium* und *Oryzaephilus* durchgeführt worden. Sowohl *Drosophila* als auch *Tribolium* und *Oryzaephilus* benötigen die Vitamine B_1 und B_2. Ein weiterer wasserlöslicher Hefefaktor, der von diesen 3 Tierarten gebraucht wird, ist nur für *Tribolium* genauer untersucht worden, während dieser Stoff bei *Drosophila* nur wenig, bei *Oryzaephilus* gar nicht einer näheren Analyse unterworfen wurde.

Nach den bisherigen Befunden spielen für Wachstum und Entwicklung der Insekten die Vitamine A, B_3, B_4, C, H im Stoffwechselgeschehen keine Rolle. Das Antisterilitätsvitamin E soll von der Larve der Bienenkönigin benötigt werden, damit sie zur Königin wird (Hill L. und E. F. Burdet 1932). Andere Nachprüfungen über den Vitamin E-Bedarf bei Fliegen verliefen ergebnislos (Bánki).

Über die Rolle, die die Vitamine B_5 und B_6 sowie der P.P.-Faktor und der Filtratfaktor in der Ernährungsphysiologie der Insekten spielen, kann etwas Genaues nicht ausgesagt werden.

Für die Brauchbarkeit der Insekten als Testtiere hat auch schon van't Hoog Beweise in seinen Untersuchungen mit *Drosophila* erbracht. Der Vorteil des Arbeitens mit *Tribolium* gegenüber *Drosophila* besteht nun darin, daß man in den *Drosophila*-Versuchen besondere Aufmerksamkeit und Mühe auf das aseptische Kulturmedium verwenden muß. Die *Tribolium*-Diäten aber, die ich verwendet habe, sind praktisch keimfrei, da es sich um verhältnismäßig trockene Medien handelt. Es war also nicht nötig, auf die Keimfreiheit der Diäten besonders zu achten.

Aus den bisherigen Untersuchungen ergibt sich auch, wie nicht anders zu erwarten war, daß die Insekten gegen Spuren der Wirkstoffe der

Nahrung empfindlich sind, und es ist weiterhin eventuell möglich, mit Hilfe dieser Tiere Aufklärung über die noch wenig erforschten Hefefaktoren, die eventuell im B_x-Komplex vorkommen, zu erhalten. Die schnelle Entwicklung und die fast unbegrenzte Menge an Tiermaterial erlauben ein billiges und schnelles Arbeiten und Austesten der Konzentrate, so daß dem Physiologen mit diesen Insekten sicher ein Mittel in die Hand gegeben ist, neue, noch unerforschte akzessorische Nährstoffe zu isolieren.

D. Literatur.

Die mit * bezeichneten Arbeiten waren mir nur in Auszügen zugänglich.

Ammon-Dirschel: Fermente, Hormone, Vitamine. Berlin 1938. — **Aschner, Manfred:** Experimentelle Untersuchungen über die Symbiose der Kleiderlaus. Naturwiss. **20**, 501—505 (1932). — **Aschner, M.** u. **E. Ries:** Das Verhalten der Kleiderlaus bei Ausschaltung ihrer Symbionten. Eine experimentelle Symbiosestudie. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **26**, 529—590 (1933). — * **Bánki, L.:** Untersuchungen über den Vitamin E-Bedarf des blauen Brummers. Allat. Közlem **34**, 21—42 (1937). — **Blechdel-Honeywell-Dutcher-Knutson:** Synthesis of vitamin B in the rumen of the cow. J. of biol. Chem. **80**, 231—238 (1928). — **Bomskov:** Methodik der Vitaminforschung. Leipzig 1935. — **Brockmann** u. **Maier:** Chemie der Vitamine und Hormone. Erg. Hyg. **20**, 155—273 (1937). — **Carter, Cyril William** and **I. R. O'Brien:** Maintenance nutrition in the pigeon. Vit. B_1. Biochemic. J. **31**, 2270—2273 (1937). — **Chapman, R. N.:** Nutritional studies on the confused flour beetle, *Tribolium confusum* Duv. J. gen. Physiol. **1924**, 565—585. — **Crowell, M. F.** and **C. M. McCay:** Nutritional studies of the webbing clothes moth. *Tineola biselliella* Hum. Physiologic. Zool. **10**, 368—372 (1937). — **Di Maria, Guiseppe:** Ricerche sulla vita asettica. Studî sul fabbisogno vitaminico e sull'azione svolta dai microorganismi per lo sviluppo della *Sarcophaga*. Arch. Zool. ital. **15**, 469 bis 506 (1938). — **Edgar, C. E.** and **T. F. Macrae:** Water-soluble B-vitamins: VIII. Essential diatary factors for the rat present in autoclaved yeast extracts in addition to lactoflavin. Biochemic. J. **31**, 886—892 (1937). — The water-soluble B-vitamins. IX. Properties of the diatary factor contained in the fuller's earth filtrate from autoclaved yeast extracts. Biochemic. J. **31**, 893—902 (1937). — The water-soluble B-vitamins. X. Nicotinsäureamide and other pyridine derivates in the nutrition of the rat. Biochemic. J. **31**, 2225—2231 (1937). — **Elvehjem:** The B-vitamins, except B_1 and the flavins. In: L. Ruzicka und W. Stepp: Ergebnisse der Vitaminforschung und Hormonforschung, Bd. 1, S. 140—158. 1938. — **Getzel, Demetrio:** Attività vitaminiche del simbionte dell'*Icerya purchasi* Mask. Boll. Zool. **7**, 157 bis 159 (1936). — Il simbionte d'*Icerya purchasi* Mask. *Geotrichoides pierantonii* n. sp. Arch. Zool. ital. **23**, 363—375 (1936). — **Glanzmann, E.:** Die wichtigsten Vitaminprobleme beim Kind. In: L. Ruzicka und W. Stepp: Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung, Bd. 1, S. 1—67. 1938. — **György:** Investigations on the vitamin B_2-complex. Biochemic. J. **29**, 748—766 (1935). — The inactivation of lactoflavin and vitamin B_6 by visible light. Biochemic. J. **29**, 767—771 (1935). — **Halliday, Nellie** and **Evans:** On the fractionation of the vitamin B_6-complex from various source materials. J. of biol. Chem. **118**, 255—267 (1937). — * **Hill, L.** and **E. F. Burdet:** Fertility of bees and Vitamin E. Nature (Lond.) **1932 II**, 540. — **Hobson, R. P.:** On a fat soluble growth factor required by blow-fly larvae. II. Identity of the growth factor with cholesterol. Biochemic. J. **29**, 2023—2026 (1935). — **Koch, A.:** Die Symbiose von *Oryzaephilus surinamensis*. Z. Morph. u. Ökol. Tiere

23, 389—423 (1931). — Symbionten und Vitamine. Naturwiss. **29**, 543 (1933). — II. Experimentelle Untersuchungen an *Oryzaephilus surinamensis*. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **32**, 137—180 (1936). — **Kollath, W.:** VIII. Biologie der Vitamine und Hormone. Eine Studie über die Unterschiede von Vitaminforschung und Krankheitsforschung. Erg. Hyg. **14**, 382—435 (1933). — Die biologische Wirkung der Vitamine und ihre Reihenfolge. Naturwiss. **29**, 537—542 (1933). — **Kuhn, Richard** u. **Gerhard Wendt:** Über das antidermatitische Vitamin der Hefe (B_6). Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 780—782 (1938). — **Kuhn, Richard** und **Gerhard Wendt:** Über das aus Reiskleie und Hefe isolierte Adermin (Vitamin B_6). Ber. dtsch. chem. Ges. **71**, 1118 (1938). * **Lafon, M.:** Les facteurs liposoluble necessaires à la croissance de *Drosophila melanogaster* Meig. C. r. Soc. Biol. Paris **124**, 798 bis 800 (1937). * Les facteurs hydrosolubles nécessaires à la croissance de *Drosophila melanogaster* Meig. C. r. Soc. Biol. Paris **124**, 800—803 (1937). — **Lehnartz:** Einführung in die chemische Physiologie. Berlin 1938. — **Melampy, R. M.** and **L. A. Maynard:** Nutrition studies with the cockroach. *Blattella germanica*. Physiologic. Zool. **10**, 36—44 (1937). — **O'Brien, I. R.:** The vitamin B_2-complex and allied factors. Avian factors. Current Sci. **6**, 490—493 (1938). — **Richardson:** A physiological study of the growth factor of the mediterranean flour moth. *Ephestia kühniella* Zell. in wheat flour. J. agricult. Res. **32**, 895—925 (1926). — * **Robbins, W. J.:** Organisms requiring vitamin B_1. Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. **24**, 53—56 (1938). — **Rudy, H.:** Vitamine und Mangelkrankheiten. Berlin 1936. — **Scheunert, A.** u. **M. Schieblich:** Über die Bildung von Vitamin B durch obligate Darmbakterien. Biochem. Z. **139**, 57—65 (1923). — Bildung von Vitamin B durch Bac. vulgatus (Flügge), Migula aus vitaminfreien Nährlösungen. Biochem. Z. **184**, 58—66 (1927). **Schlieper, Carl:** Stoffwechsel der Organe und Gesamtstoffwechsel. In M. Hartmann: Fortschritte der Zoologie, Bd. 3. 1937. — **Schmitz, E.:** Kurzes Lehrbuch der chemischen Physiologie. Berlin 1937. — **Sweetman, M. D.** and **S. S. Palmer:** Insects as test animals in vitamin research. J. of biol. Chem. **77**, 33—52 (1928). — **Stepp, W.** u. **Kühnau:** Vitamine. Klinische Fortbildung. Neue deutsche Klinik, Erg.-Bd. 1, S. 41—96. 1933. — **Stepp, W., J. Kühnau** u. **H. Schroeder:** Die Vitamine und ihre klinische Anwendung. Stuttgart 1937. — **Trager, W.:** The culture of mosquito larvae free from living microorganisms. Amer. J. Hyg. **22**, 18—25 (1935). — On the nutritional requirements of mosquito larvae. *Aedes aegypti*. Amer. J. Hyg. **22**, 475—493 (1935). — The utilization of solutes by mosquito larvae. Biol. Bull. Mac. biol. Labor Woods Hole **71**, 343—352 (1936). — A growth factor required by mosquito larvae. J. of exper. Biol. **14**, 240—251 (1937). — **Van't Hoog:** Aseptic Culture of Insects in Vitamin Research. Z. Vitaminforsch. **4**, 300—323 (1935); **5**, 118—125 (1936). — **Euler, v.:** Bedeutung der Wirkstoffe Ergone, Enzyme und Hilfsstoffe im Zellenleben. In L. Ruzicka und W. Stepp: Ergebnisse der Vitamin- und Hormonforschung, Bd. 1, S. 159—190. 1938. — **Wiggelsworth, V. B.:** Symbiontic bacteria in a blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* Stal. Parasitology **28**, 284—289 (1936). — **Zacher, F.:** Die Vorrats-, Speicher- und Materialschädlinge und ihre Bekämpfung. Berlin 1927. — Haltung und Züchtung von Vorratsschädlingen. Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden 1933, Lieferung 416.

Lebenslauf.

Am 28. März 1913 wurde ich als Sohn des Eisenbahnangestellten August Fröbrich und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Schinke, in Groß-Rosen, Kreis Striegau, geboren. Dort besuchte ich zunächst die Volksschule, später die Mittelschule in Breslau und schließlich die Oberrealschule zu Liegnitz, an der ich Ostern 1932 das Reifezeugnis erwarb. Ab Sommersemester 1932 studierte ich an der Universität Breslau die Fächer: Biologie, Chemie, Physiologie und Leibesübungen. Am 26. April 1939 bestand ich das Examen rigorosum mit den Fächern: Zoologie, Botanik, Chemie. Seit Oktober 1938 verwalte ich eine planmässige Assistentenstelle am Zoologischen Institut der Universität Breslau.

Gustav Fröbrich.